

Biochimie

Acides Aminés, Peptides et Protéines

Chikouche Ammar

LES ACIDES AMINÉS

Plan

- **Introduction**
- **Définition** des acides aminés
- **Structure des Aa**
- Importance biologique
- Classification: Les acides aminés naturels
- Nomenclature des Aa
- Les Aa essentiels
- Les autres acides aminés

- **Propriétés physiques des Aa**

- **Propriétés chimiques des Aa**

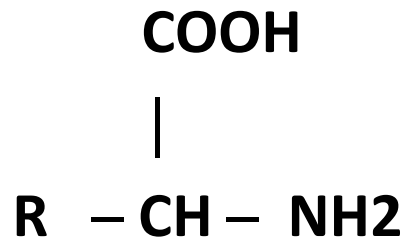
- **Méthodes d'étude des Aa**

Introduction

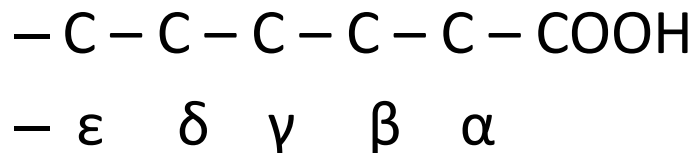
- Les acides aminés sont les constituants fondamentaux des protéines.
- Plus de 300 acides aminés ont été inventoriés.
- Synthétisés par les animaux, les micro-organismes et les végétaux.
- Source :
 - Exogène : apport alimentaire
 - Endogène : catabolisme des Protéines
- On distingue deux catégories :
 - 1. Les Aa naturels « standards »: 20 différents Aa protéinogènes sont trouvés soit dans des petits peptides (<20 Acides aminés) soit formant des protéines.
 - 2. Les autres Aa. Dont certains sont trouvés à l'état libre (ornithine et la citrulline)..

Définition

- Les acides aminés ou aminoacides sont des molécules chimiques, qui possèdent deux fonctions:
 - Une fonction acide carboxylique **COOH**;
 - Une fonction amine primaire **NH₂**;

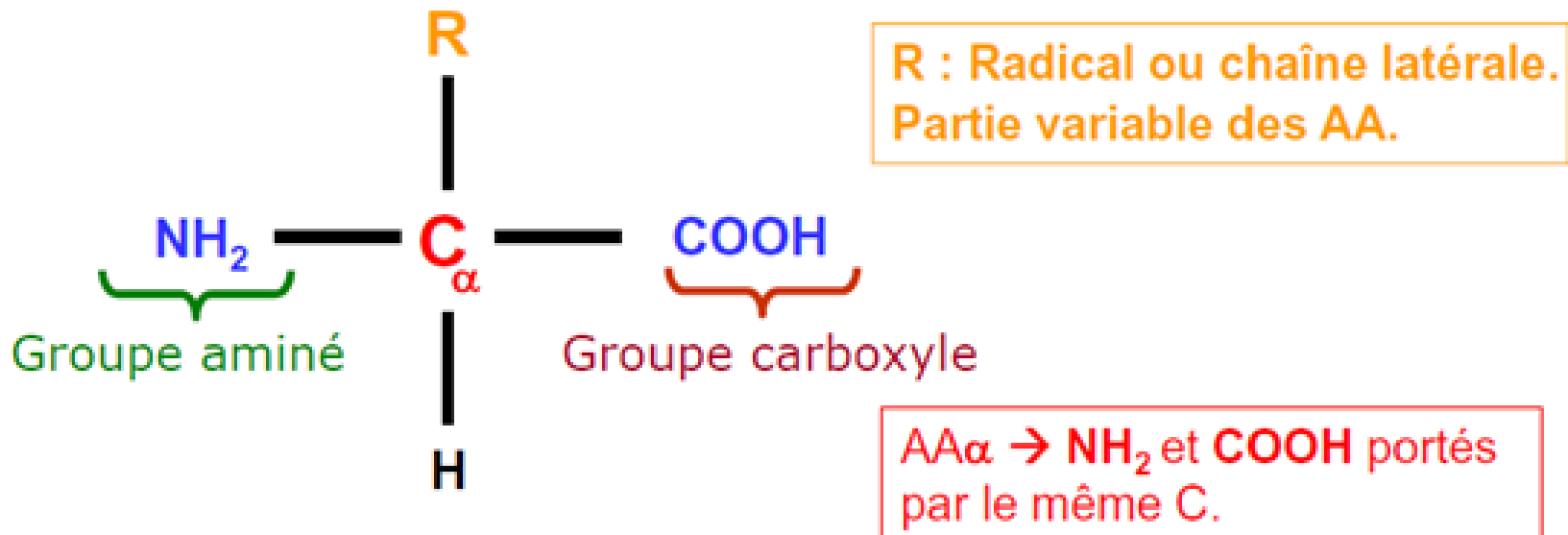


- Ces deux fonctions sont portés par un même atome de carbone (noté α)
- Les Aa diffèrent par la nature de la chaîne latérale R.
- Remarque** : Nomenclature des carbones d'une chaîne



Structure d'un acide aminé

- Les Aa ont un motif structural commun



Différents acides aminés

- Les Aa naturels: 20 Aa qui sont incorporés dans les protéines lors de la traduction (Aa standards) + 1 Aa.

Alanine	Glycine	Proline
Arginine	Histidine	Sérine
Asparagine	Isoleucine	Thréonine
Acide aspartique	Leucine	Tryptophane
Cystéine	Lysine	Tyrosine
Acide glutamique	Méthionine	Valine
Glutamine	Phénylalanine	Sélénocystéine

- Autres:
 - Aa modifiés: hydroxyproline, hydroxylysine, phosphosérine.
 - Aa impliqués dans des voies métaboliques : méthyl-histidine, homocystéine, acide gamma hydroxybutyrique ...

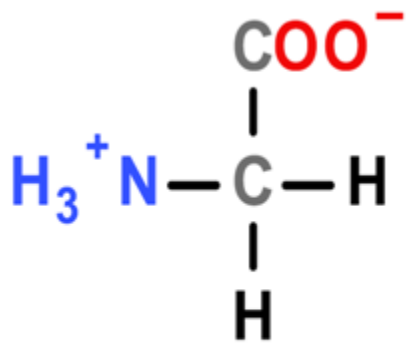
Rôle des acides aminés

- Le rôle des acides aminés est multiple:
 - *Structurale* : monomères des protéines.
 - *Energétique* : substrats énergétiques.
 - *Métabolique* : précurseurs de molécules d'intérêt biologique ou intermédiaires métaboliques.

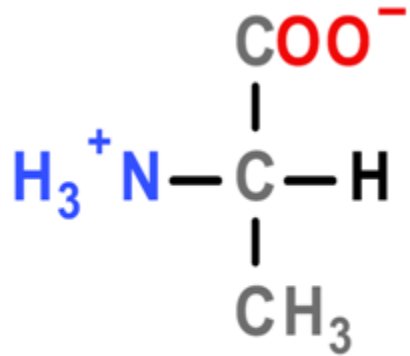
Classification des acides aminés naturels

- **Neutre:** un groupe amino, un groupe carboxyle et une chaîne latérale:
 - Aliphatique
 - Hydroxylée
 - Soufrée
 - À noyau aromatique
 - Cyclique
- **Acide:** un groupe aminé, un groupe carboxylé et une chaîne latérale carboxylée
- **Basique:** un groupe aminé, un groupe carboxylé et chaîne latérale basique

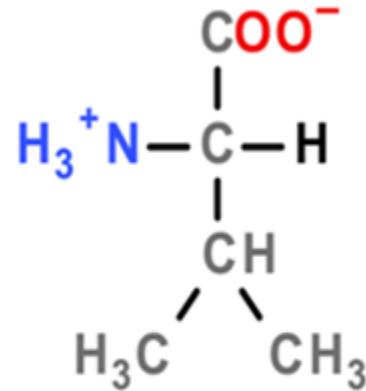
Les acides aminés standards



Glycine

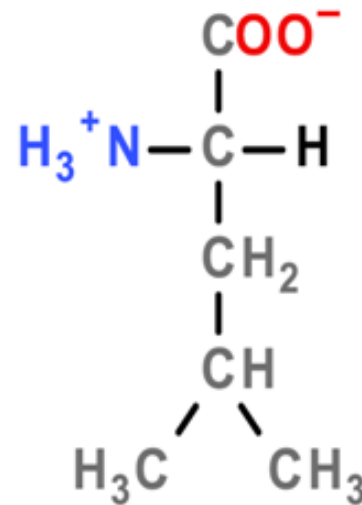


Alanine

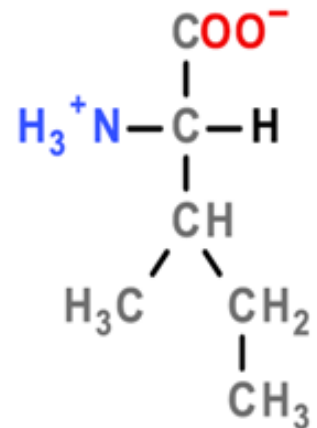


Valine

Aliphatique



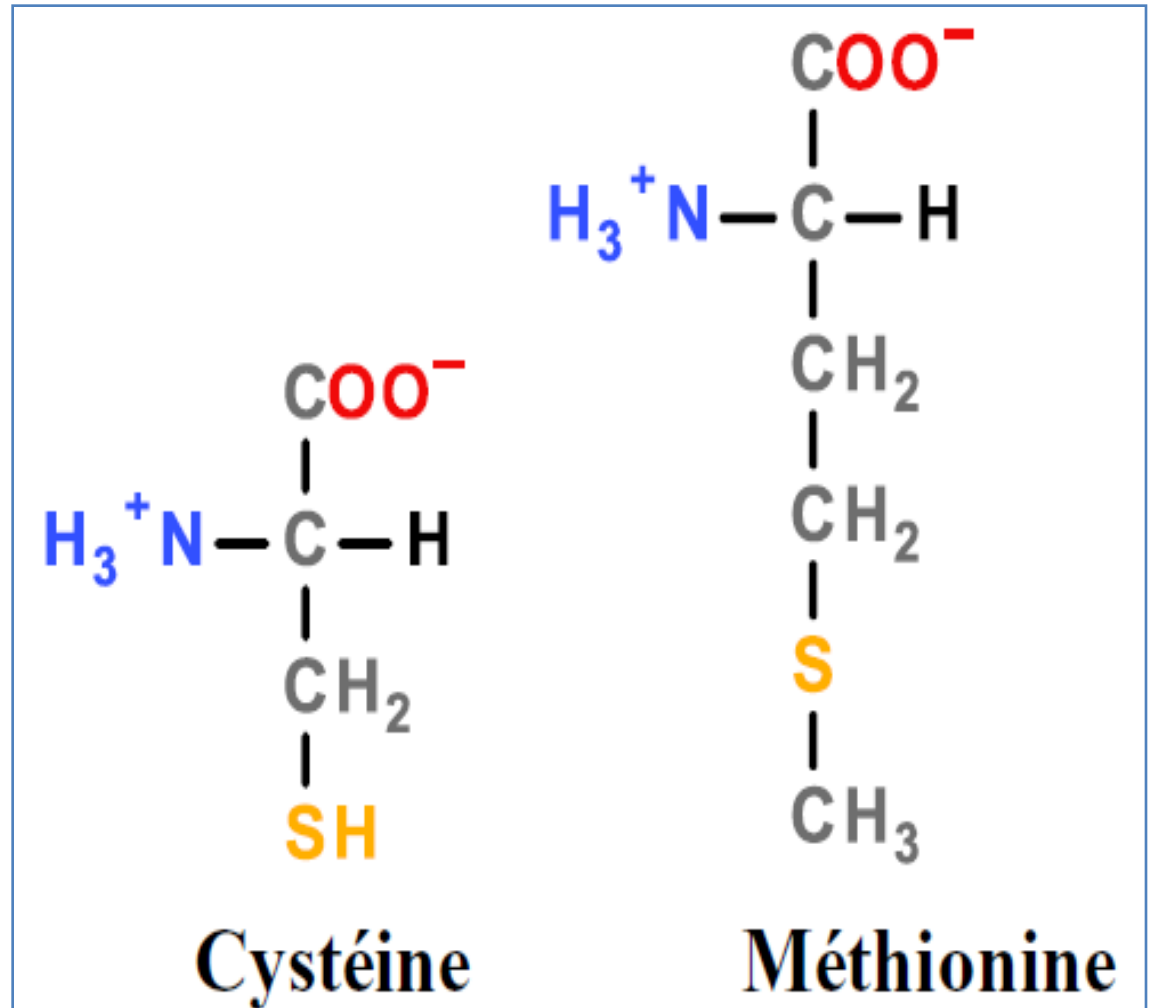
Leucine



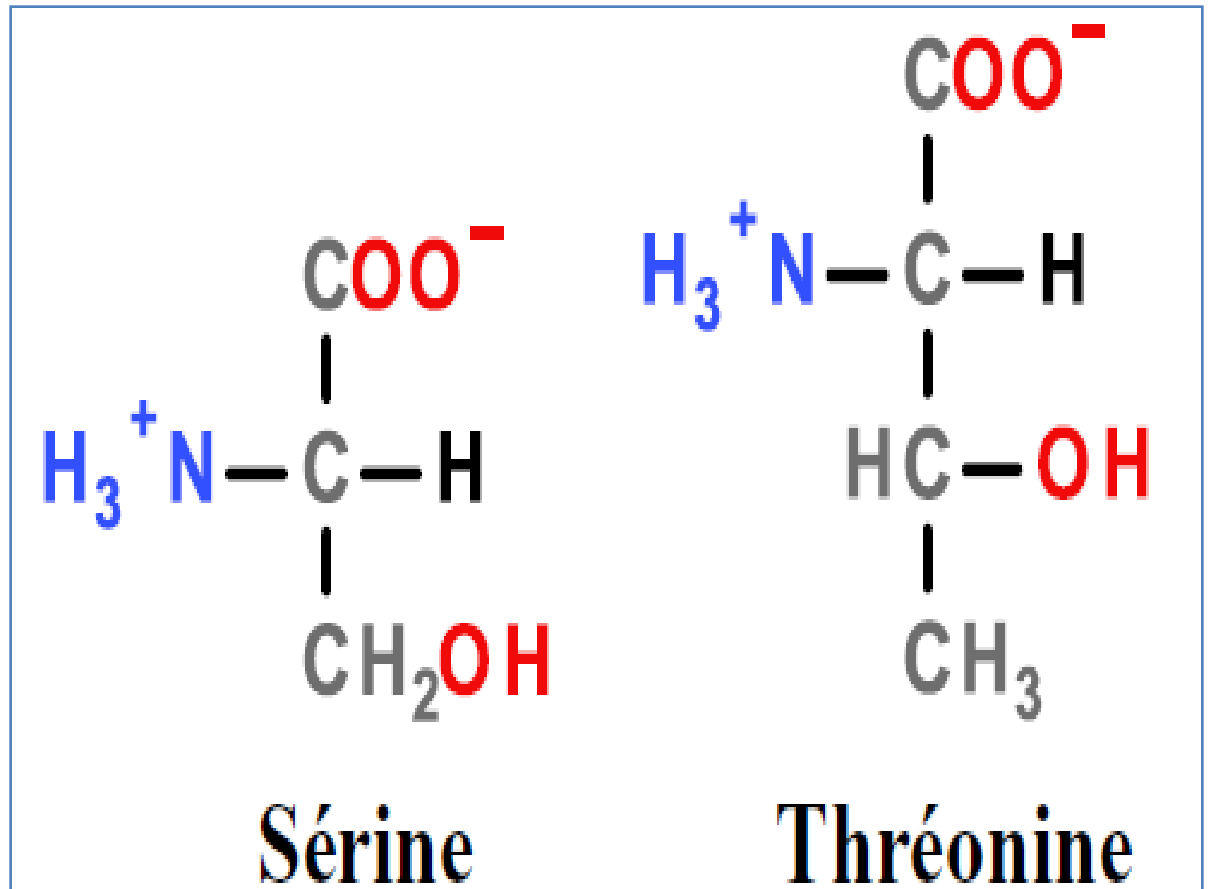
Isoleucine

Les acides aminés standards

Acides aminés soufrés

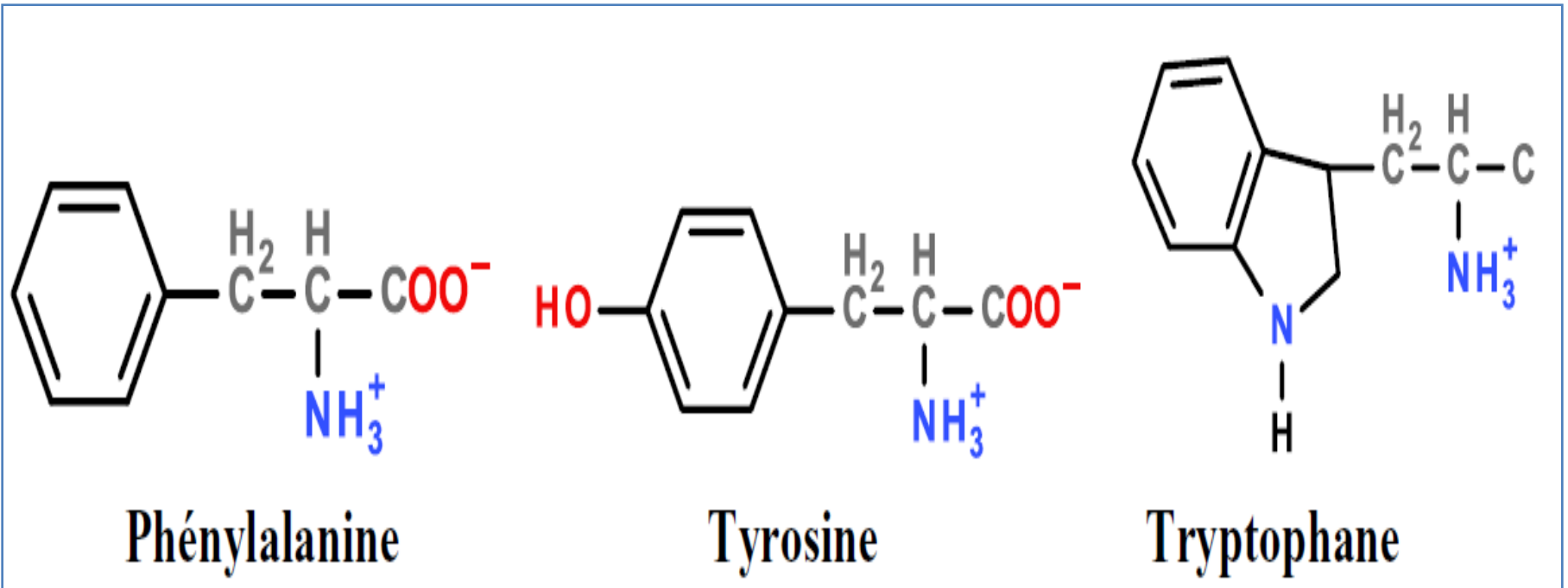


Les acides aminés standards



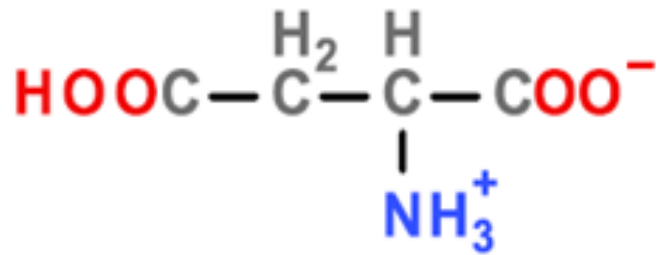
Acides aminés hydroxylés

Les acides aminés standards

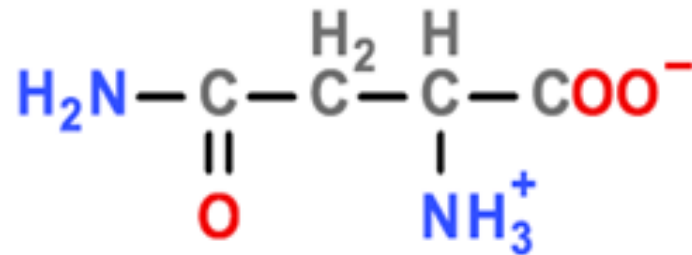


Acides aminés à noyaux aromatique

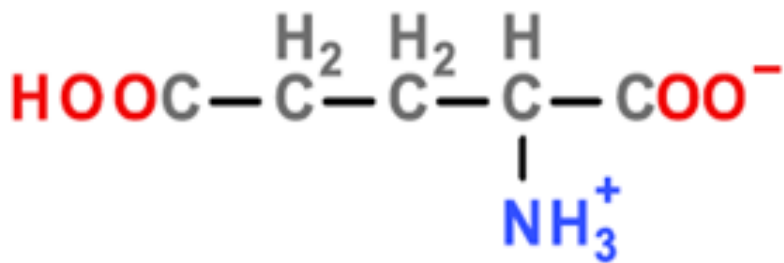
Les acides aminés standards



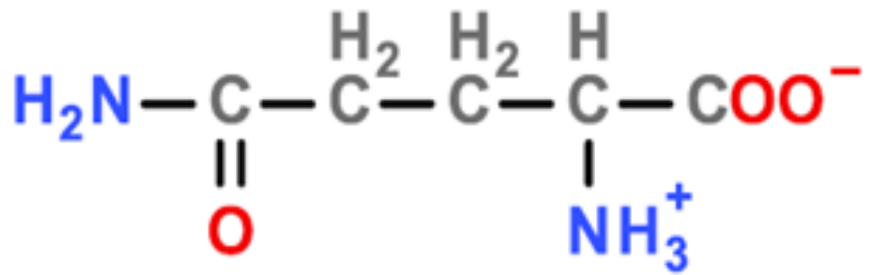
Acide aspartique



Asparagine



Acide glutamique

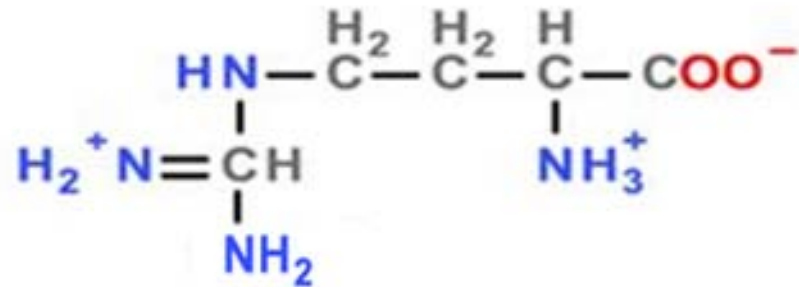


Glutamine

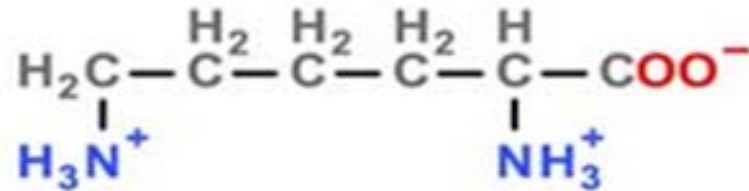
Diacides et leurs amides

Les acides aminés standards

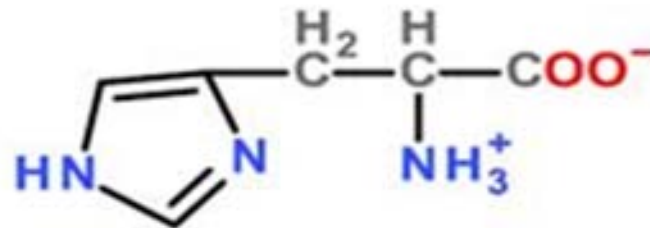
Acides aminés basiques



Arginine



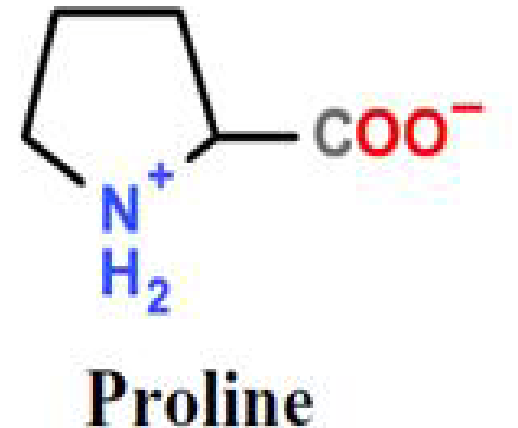
Lysine



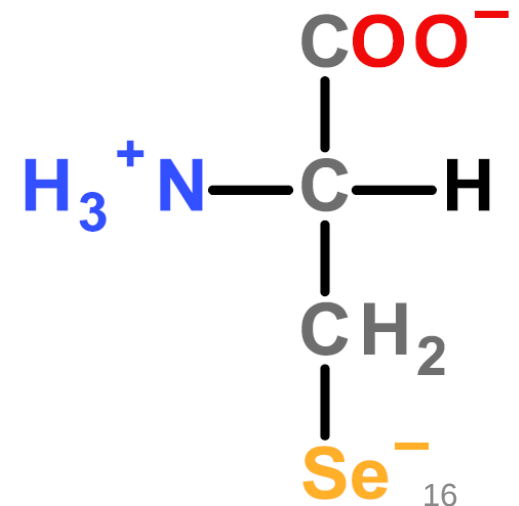
Histidine

Remarques

- **1- *Proline*:** Acide iminé à chaîne latérale cyclique)



- **2- *Sélénocystéine*:** Acide aminé avec du sélénium à la place du soufre; entre dans la constitution de certaines enzymes (glutathion peroxydase).



Classification des acides aminés selon la polarité de la chaîne latérale R à pH neutre

- *1) Polaires*
 - Non ionisables : *Non chargées à pH neutre*
 - Sérine, thréonine, asparagine, glutamine, cystéine et tyrosine.
 - Ionisables :
 - *Chargées négativement à pH neutre*
 - Acide aspartique, acide glutamique,
 - *Chargées positivement à pH neutre*
 - Lysine, arginine et histidine
- *2) Non polaire : Non chargées à pH neutre (apolaire ou hydrophobe)*
 - Glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, méthionine, phénylalanine, tryptophane et proline

Nomenclature des acides aminés

Codage des Aa.

Nom	Code à 3 lettres	Code à 1 lettre	Nom	Code à 3 lettres	Code à 1 lettre
Alanine	Ala	A	Leucine	Leu	L
Arginine	Arg	R	Lysine	Lys	K
Asparagine	Asn	N	Méthionine	Met	M
Acide aspartique	Asp	D	Phénylalanine	Phe	F
Acide glutamique	Glu	E	Proline	Pro	P
Cystéine	Cys	C	Sérine	Ser	S
Glutamine	Gln	Q	Thréonine	Thr	T
Glycine	Gly	G	Tryptophane	Trp	W
Histidine	His	H	Tyrosine	Tyr	Y
Isoleucine	Ile	I	Valine	Val	V
			Sélenocystéine	Sec	¹⁸ U

Les acides aminés essentiels

- Acide aminé essentiels: la valine, la leucine, l'isoleucine, la phénylalanine, le tryptophane, la lysine, la méthionine et la thréonine

Lysine et Thréonine: Absolument essentiels.

- Acides aminés parfois essentiels, dans certaines conditions (grossesse, croissance) l'histidine et l'arginine deviennent essentielles.

(Arg +++ = chez le Nourrisson)

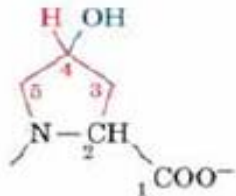
- Semi essentiels : tyrosine et la cystéine (phénylalanines et la méthionine)

Méthionine	Met	M
Leucine	Leu	L
Valine	Val	V
Lysine	Lys	K
Isoleucine	Ile	I
Phénylalanine	Phe	F
Tryptophane	Trp	W
Histidine	His	H
Thréonine	Thr	T
Arginine	Arg	R

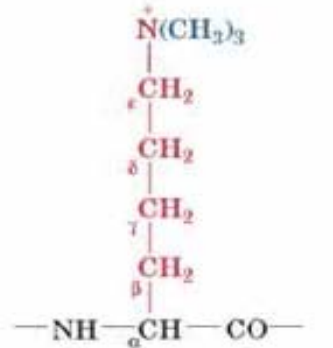
Pour retenir: « Mets-le dans la valise, il fait trop d'histoires »

Met-Leu-Val-Lys-Ile-Phe-Trp-His-Thr (plus l'Arg)

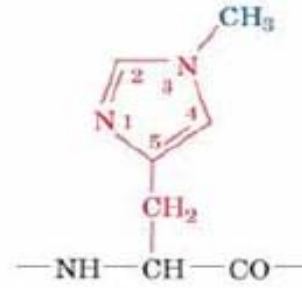
Aa modifiés après la traduction des protéines



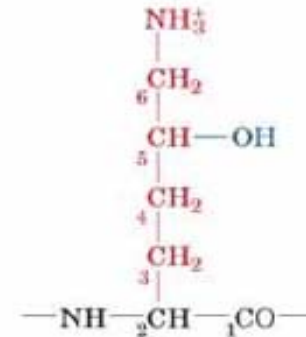
4-Hydroxyproline



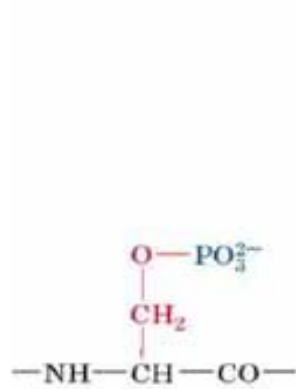
ε-N,N,N-Trimethyllysine



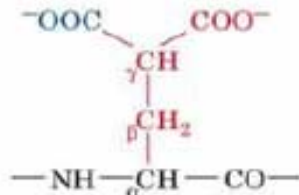
3-Methylhistidine



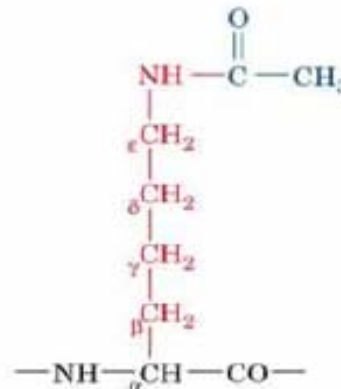
5-Hydroxylysine



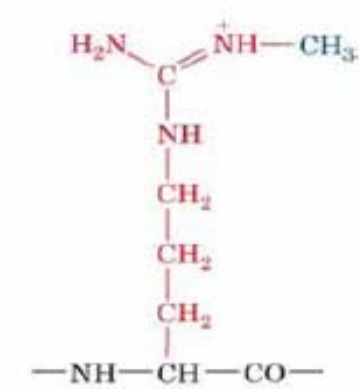
O-Phosphoserine



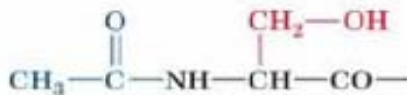
γ-Carboxyglutamate



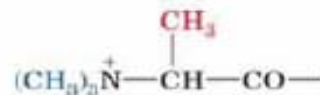
ε-N-Acetyllysine



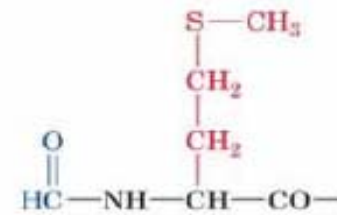
ω-N-Methylarginine



N-Acetylserine

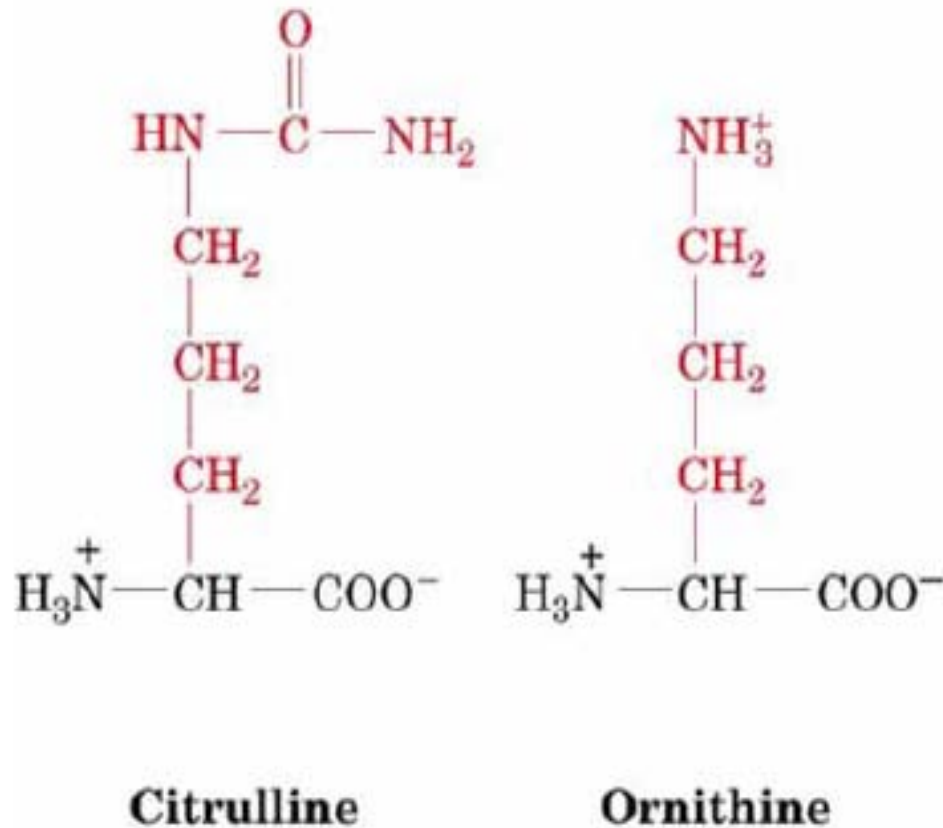


N,N,N-Trimethylalanine



N-Formylmethionine

Aa entrant dans des métabolismes



Ces Aa ne sont pas utilisés pour produire des protéines, mais entrent dans des métabolismes

III) Propriétés physico chimiques des acides aminés

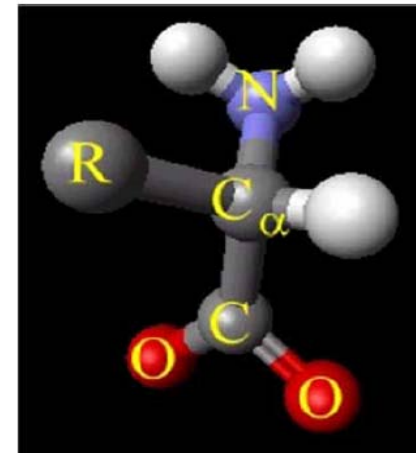
- **1) Propriétés physiques**
 - A- Solubilité
 - B- Stéréochimie des acides α aminés (Notation D, L)
 - C- Pouvoir rotatoire des Aa
 - D- Propriétés ioniques
 - E- Propriétés spectrales

A- Solubilité

- Les Aa sont solubles dans l'eau.
- Les plus solubles sont les plus petit (glycocolle) ou ceux qui portent des radicaux mouillables comme NH_2 , COOH ou OH (sérine),
- Les acides aminés à long chaine carbonée sont peu solubles dans l'eau.
- Faiblement solubles dans l'alcool.
- La solubilité dans les solvants apolaires dépend de la chaine latérale.
- En présence de deux phases liquides (éthanol/eau), les aminoacides se répartissent dans les deux phases avec des coefficients de partage spécifique : cette propriété est utilisée pour les classer .

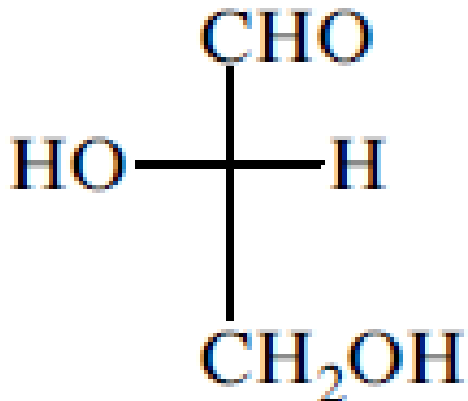
B- Stéréochimie des acides α aminés

- Les acides aminés comprennent tous, 1 ou 2 carbones asymétriques: ce sont des **molécules chirales**, à l'exception de la glycine.
- L'atome de carbone asymétriques appelé *centre de la chiralité* est lié à quatre substituant différents donc substitué asymétriquement.
- Il existe 2 stéréo-isomères de configuration différentes
 - D-acide aminé et L-acide aminé
- Ils sont appelées “**énantiomères**” (non superposables; images l'un de l'autre dans un miroir)

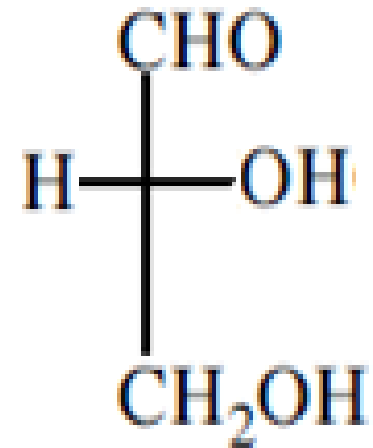


Notation D, L

- Les configurations absolues de toutes les molécules dérivées du carbone sont rapportées au D-glycéraldéhyde [isomère (+)] et L-glycéraldéhyde [isomère (-)].

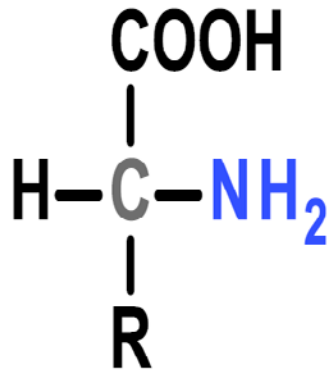


L-glycéraldéhyde

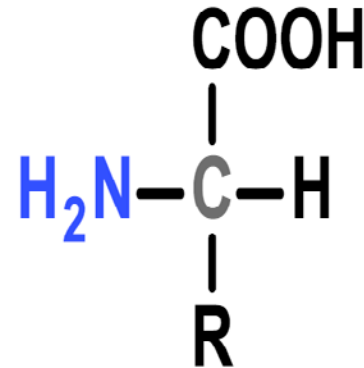


D-glycéraldéhyde

Notation D, L



D-Acide aminé



L-Acide aminé

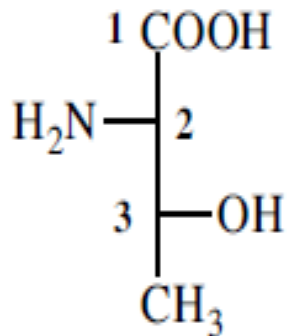
- En règle générale les acides aminés présents dans les protéines naturelles appartiennent à la série L.
- Mais on peut trouver des acides aminés de configuration D dans certains produits naturels (antibiotiques peptidiques...)

Notation D, L

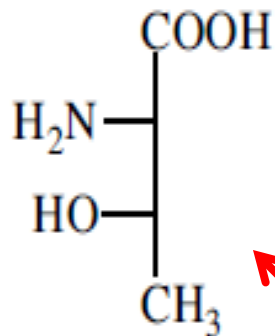
- Cas d'acides aminés ayant un deuxième centre chiral.
- 2^n structures isomériques (n = nombre de centres chiraux)
- Cela correspondent à 2 paires d'énantiomères
- Des isomères qui diffèrent par un seul des centres asymétriques sont des **diastéromères**

Notation D, L

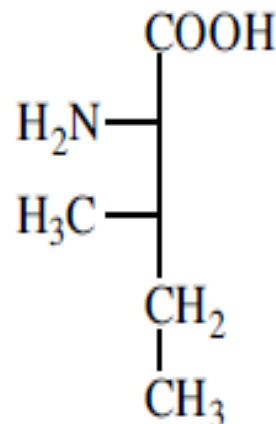
- Le carbone 3 (β) de la thréonine et de l'isoleucine est aussi un centre chiral
- Leur énantiomère (L) existe sous deux formes épimères.
- On affecte le préfixe "**allo**" à l'épimère que l'on ne trouve pas dans les protéines :



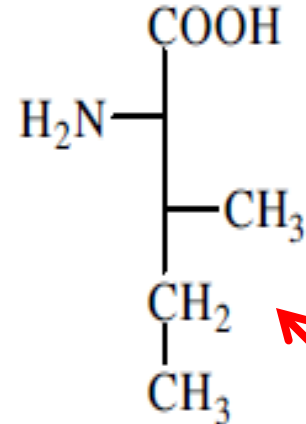
L-thréonine



L-allo-thréonine



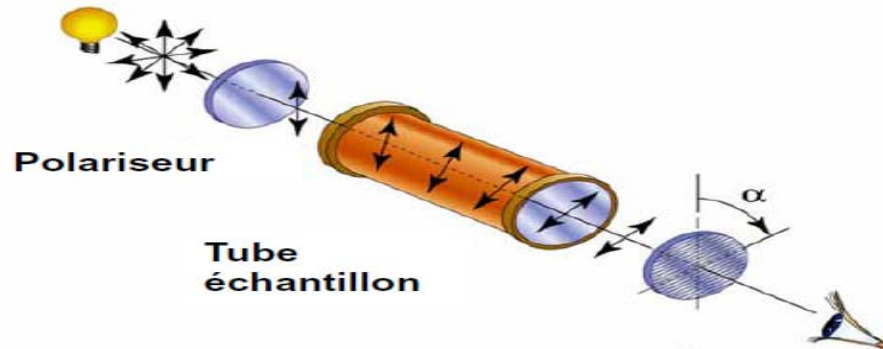
L-isoleucine



L-allo-isoleucine

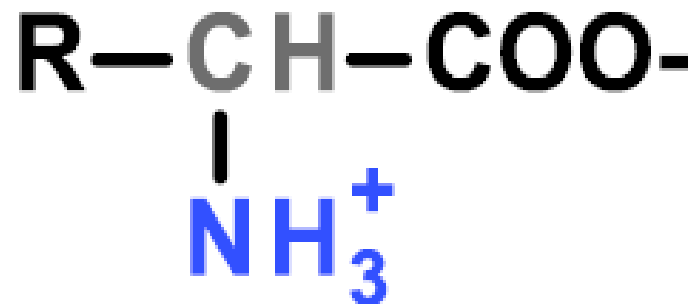
C- Pouvoir rotatoire des Aa

- Les énantiomères possèdent une **activité optique**:
 - C'est la propriété de dévier la lumière polarisée;
- Placés dans le faisceau d'une lumière polarisée plane, ils provoquent la rotation du plan de polarisation.
 - Si la rotation s'effectue dans le sens des aiguilles d'une montre, on dit que la molécule est **dextrogyre (+)**
 - Si la rotation s'effectue dans le sens inverse des aiguilles d'une montre, on dit que la molécule est **lévogyre (-)**



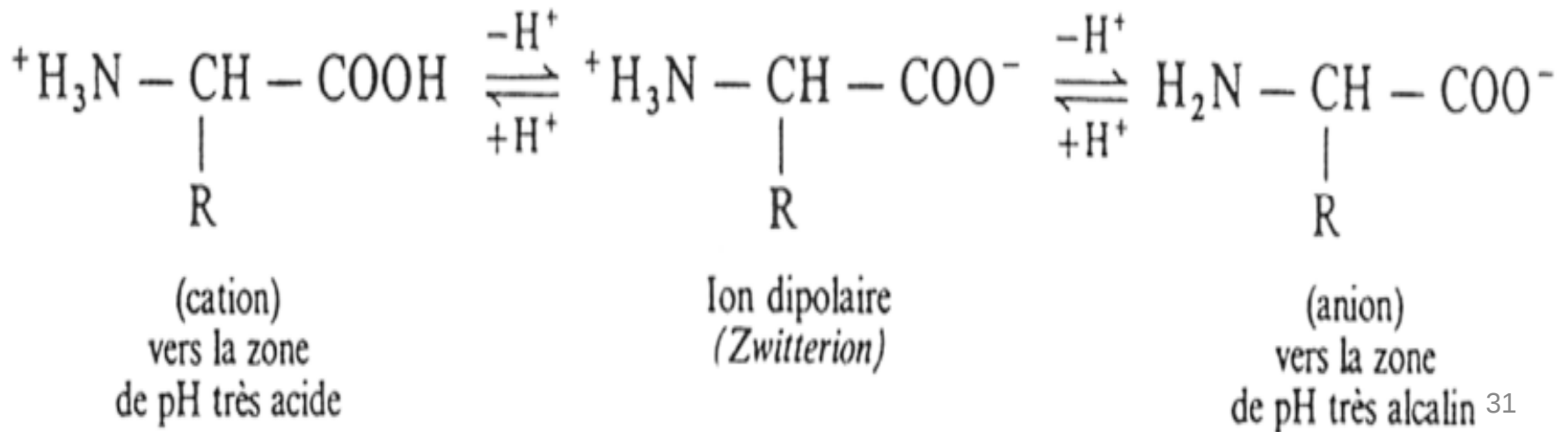
D- Propriétés ioniques (ou Propriétés acido basique des acides aminés)

- Les aminoacides possèdent deux groupements ionisables à PH convenable,
 - 1 fonction acide -COOH et
 - 1 fonction basique -NH₂.
- Ils prennent la forme dipolaire ou ion mixte, ce sont des **molécules amphotères**.
- Ils peuvent agir comme des acides et comme des bases.



Ionisation, effet du pH

- La forme dipolaire peut,
 - En milieu acide, accepter un proton (H^+) sur le groupement (COO^-);
 - En milieu alcalin perdre un proton (H^+) du groupement (NH_3^+).
- En allant du PH très acide à PH très alcalin, l'évolution des charges peut être schématiser comme suit:



Point isoélectrique (pHi)

- Tous les acides aminés possèdent un point isoélectrique ou PI,
- $PI = pH$ pour lequel l'Aa en solution tamponnée a une charge nette nulle (somme des charges intramoléculaires est nulle).
- L'Aa apparaît à ce PH comme étant **neutre** (alors qu'il a au moins deux charges intra moléculaires réalisant un **zwitterion**).

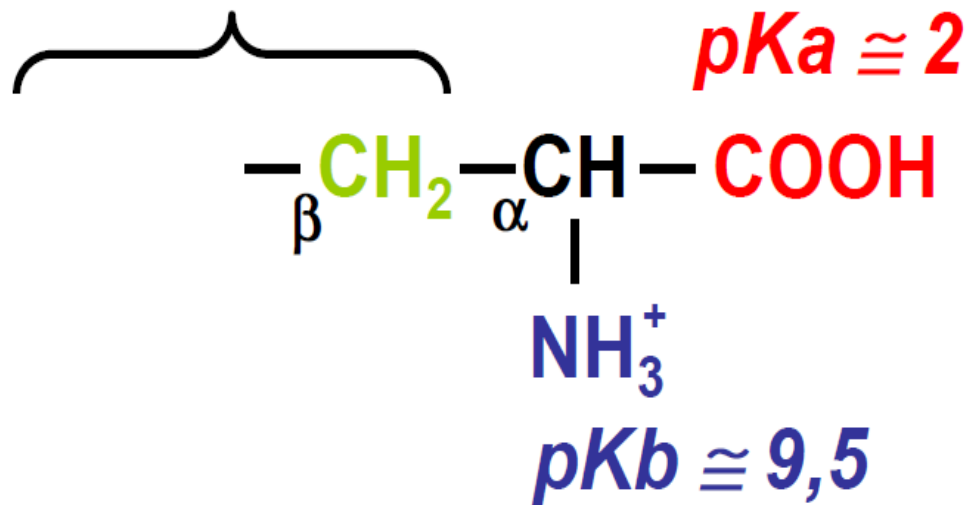


- Le zwitterion possède autant de charges positives que de charges négatives, par
 - Le groupement carboxylique chargé négativement
 - Le groupement aminé, chargé positivement
 - Les groupements ionisables de leurs chaînes latérales.

Point isoélectrique (pHi)

- $PI = \frac{PKa \text{ (groupe carboxyle)} + PKb \text{ (groupe amine)}}{2}$

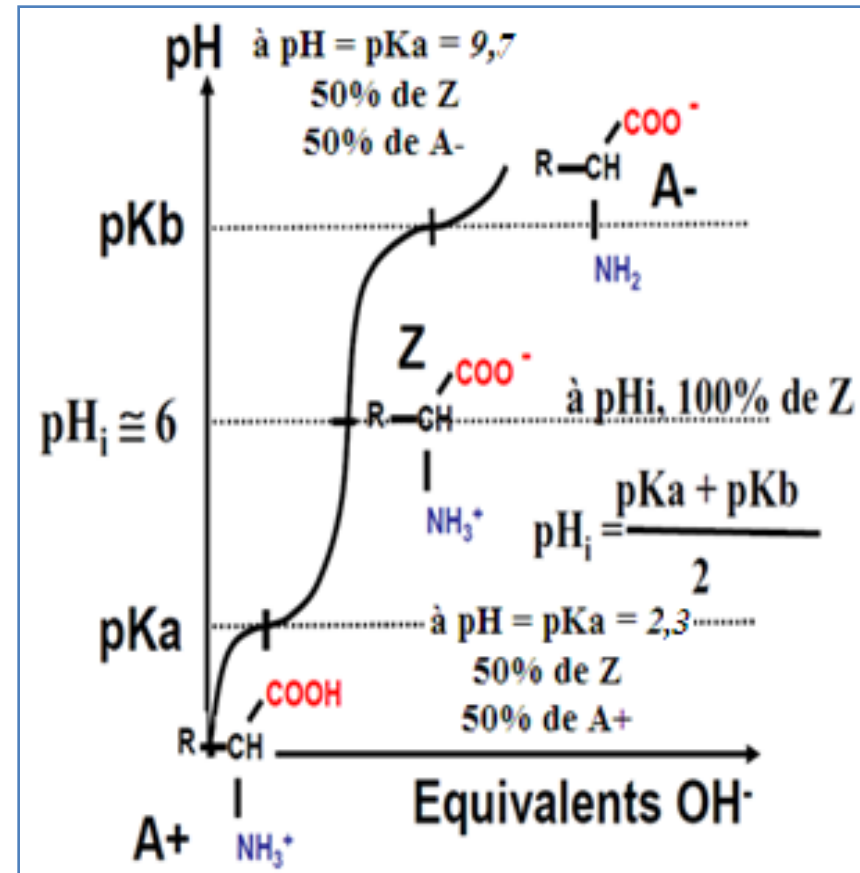
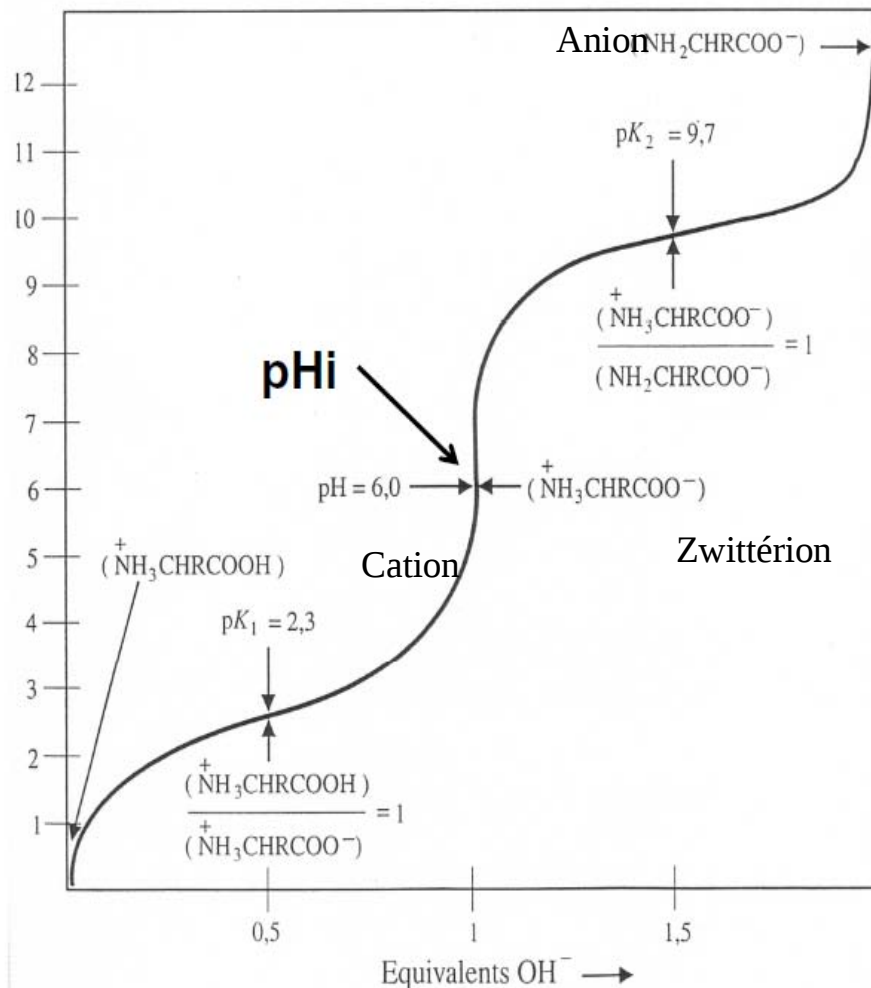
pK_R variable



- $pK = pH$ de demie-dissociation = 50% du groupement est dissocié.

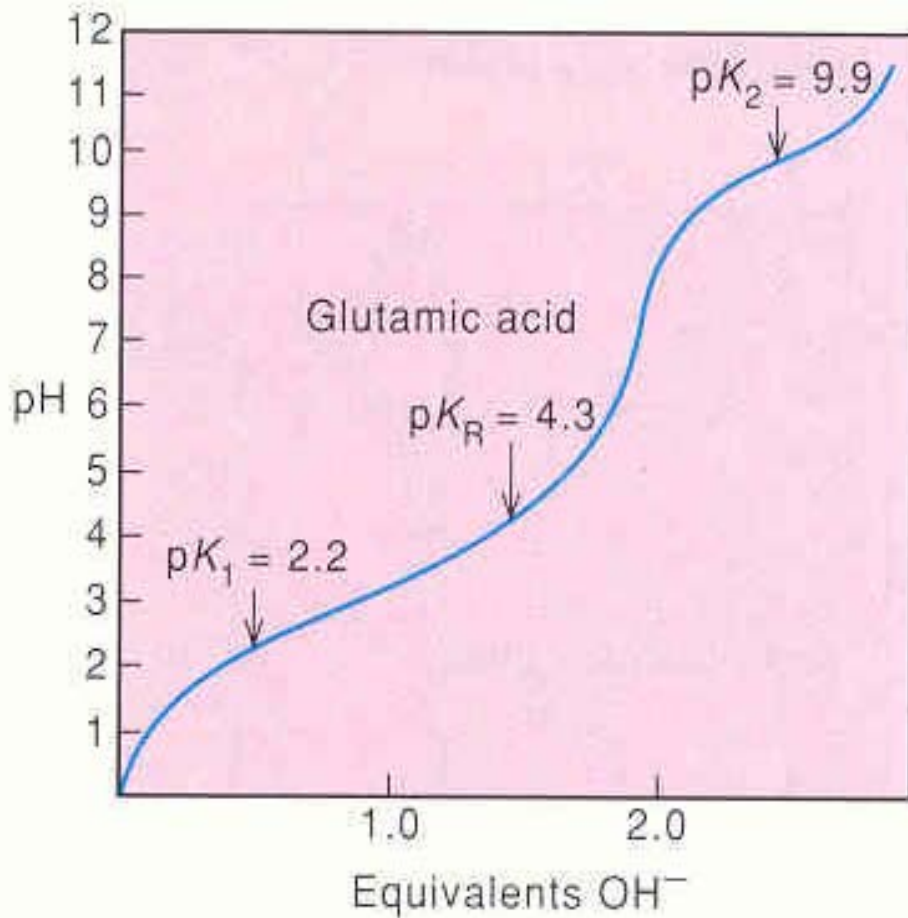
Ainsi une courbe de titration, peut être tracée et interprétée en fonction de la variation du PH pour les acides aminés

Courbe de titration d'un acide aminé monoaminé et monocarboxylique: (l'alanine)

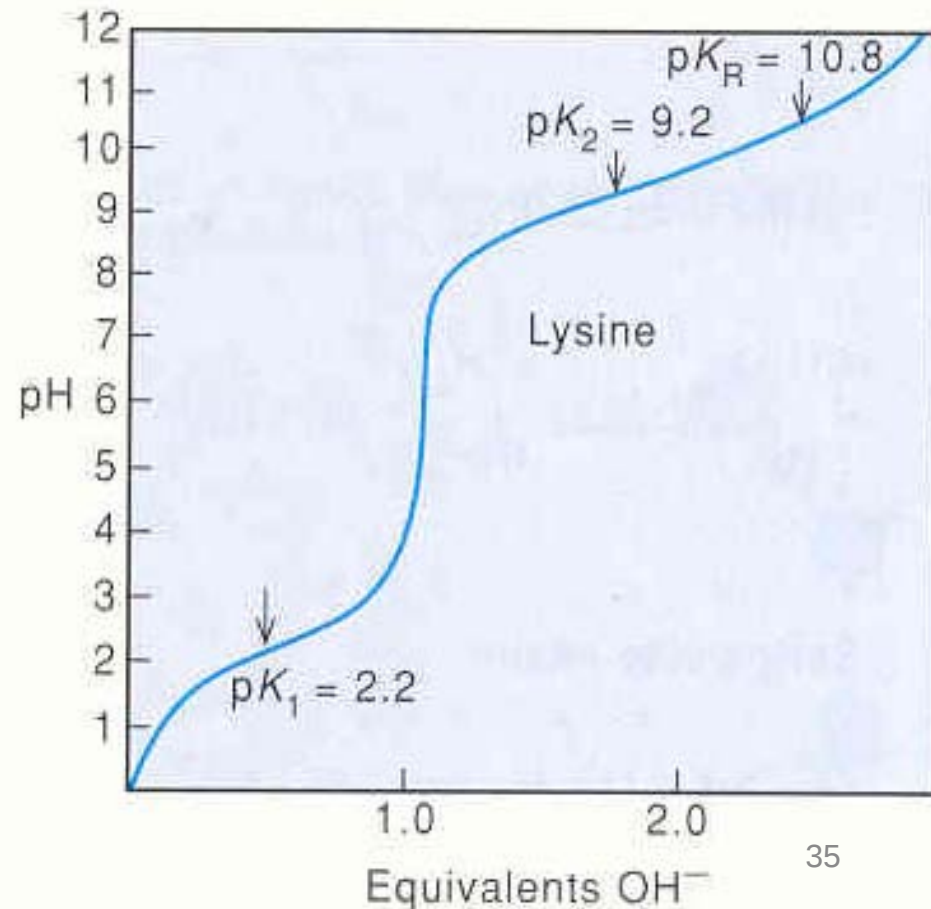


Courbe de titration

L'Acide glutamique



La lysine



Constantes caractéristiques des différents Aa

Code	Abrév.	Acide aminé	pK _a (α-COOH)	pK _b (α-NH ₃)	pK _c (chaîne latérale)	pl	Masse molaire	(% protéines humaines)
A	Ala	Alanine	2,35	9,87	-	6,01	89	7,8
C	Cys	Cystéine	1,92	10,70	8,18	5,05	121	1,9
D	Asp	Acide aspartique	1,99	9,90	3,90	2,85 	133	5,3
E	Glu	Acide glutamique	2,10	9,47	4,07	3,15 	147	6,3
F	Phe	Phénylalanine	2,20	9,31	-	5,49	165	3,9
G	Gly	Glycine	2,35	9,78	-	6,06	75	7,2
H	His	Histidine	1,80	9,33	6,04	7,60 	155	2,3
I	Ile	Isoleucine	2,32	9,76	-	6,05	131	5,3
K	Lys	Lysine	2,16	9,06	10,54	9,60 	146	5,9
L	Leu	Leucine	2,33	9,74	-	6,01	131	9,1
M	Met	Méthionine	2,13	9,28	-	5,74	149	2,3
N	Asn	Asparagine	2,14	8,72	-	5,41	132	4,3
P	Pro	Proline	1,95	10,64	-	6,30	115	5,2
Q	Gln	Glutamine	2,17	9,13	-	5,65	146	4,2
R	Arg	Arginine	1,82	8,99	12,48	10,76 	174	5,1
S	Ser	Sérine	2,19	9,21	-	5,68	105	6,8
T	Thr	Thréonine	2,09	9,10	-	5,60	119	5,9
U	Sec	Sélénocystéine			5,73		168	-
V	Val	Valine	2,39	9,74	-	6,00	117	6,6
W	Trp	Tryptophane	2,46	9,41	-	5,89	204	1,4
Y	Tyr	Tyrosine	2,20	9,21	10,46	5,64	181	3,2

Récapitulatif

- Le point isoélectrique (pHi) est le pH où un Aa se trouve dans sa forme neutre .
- A ce pH, l'Aa existe presque exclusivement sous la forme dipolaire.
- A un pH supérieur au point isoélectrique, les acides aminés forment des anions; au dessous de ce pH critique, ils fixent des protons et existent à l'état de cations.
- Le pHi pour les acides aminés neutres va de pH 4,8 à 6,3.
- Pour les acides aminés basiques, le pHi s'étend de 7,8 à 10,8
- Pour les acides aminés acides, le pHi va de 2,7 à 3,2.

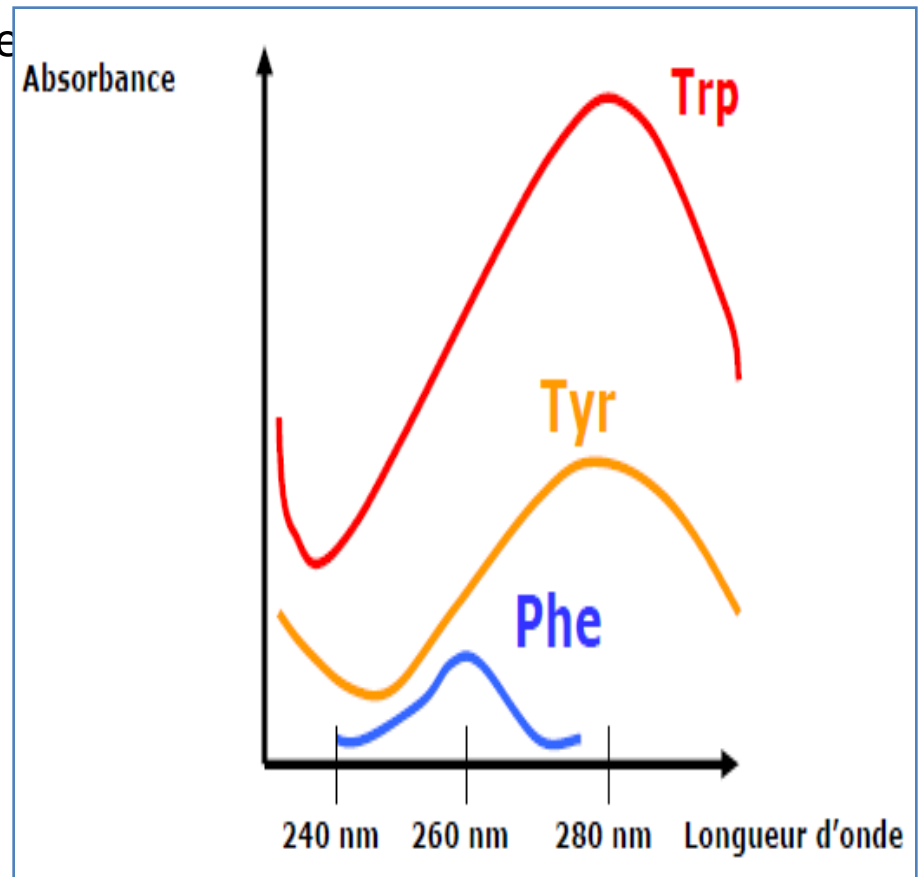
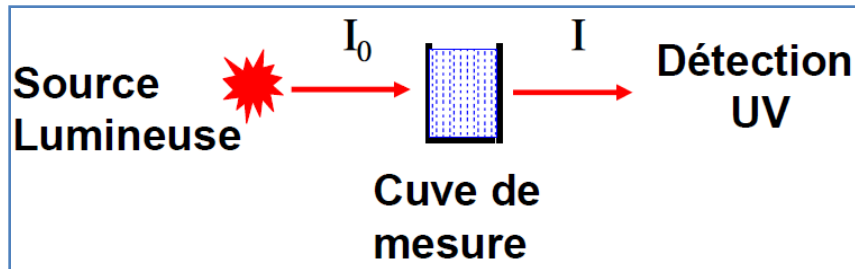
E- Propriétés spectrales

Coloration et absorption de la lumière

Les solutions d'Aa sont incolores, mais sont visibles en **UV**: $\lambda < 230 \text{ nm}$

Les Aa aromatiques absorbent vers 280 nm

Utile pour repérer la présence de protéine



III) Propriétés physico chimiques des acides aminés

- 2) Propriétés chimiques :

- A- Propriétés de la fonction carboxylique

- Estérification par un alcool
 - Formation d'amide (liaison peptidique)
 - Réaction de décarboxylation

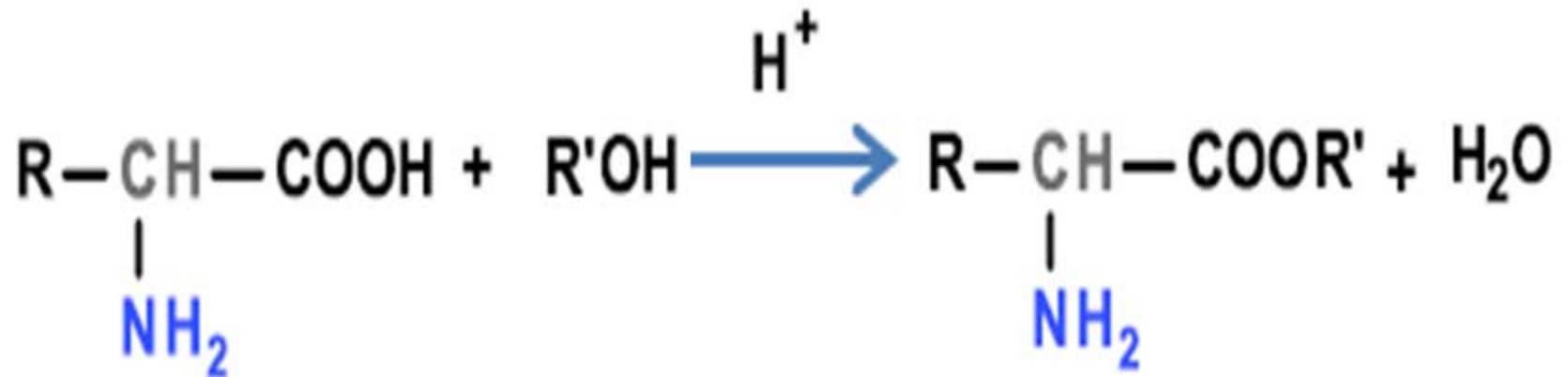
- B- Propriétés générales liées au groupe NH₂

- Formation d'imine « base de Schiff » : réaction avec un aldéhyde
 - N-Acylation
 - Action du 1-fluoro 2,4- dinitrobenzène
 - Action du phénylthiocyanate
 - Dansylation
 - Désamination, *transamination*
 - Réaction avec la ninhydrine : désamination oxydative

- C- Propriétés des chaînes latérales.

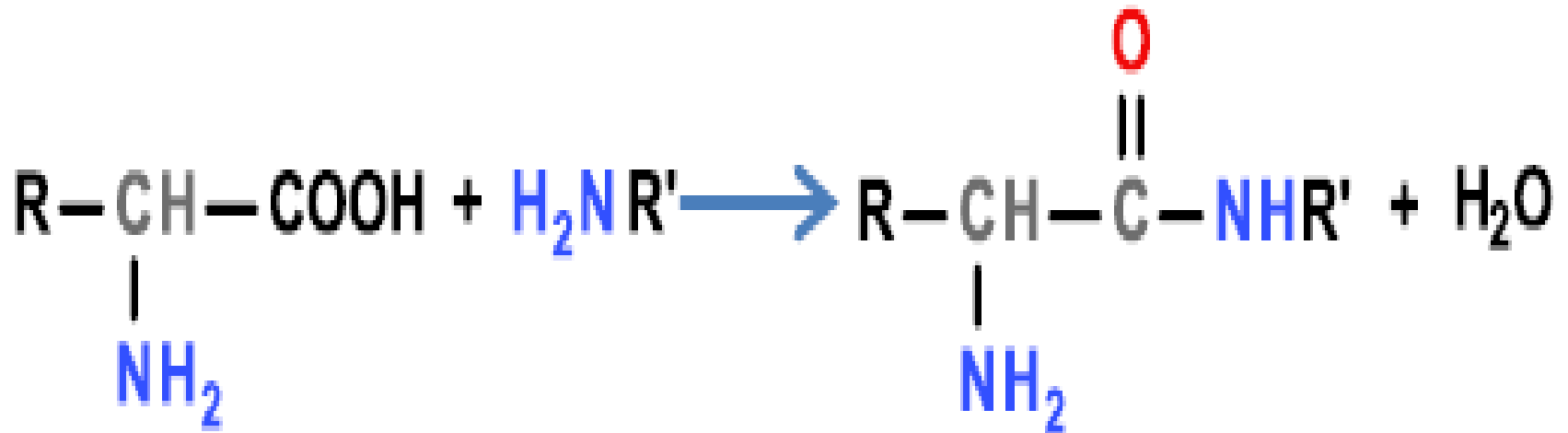
A- Propriétés de la fonction carboxylique

- **Estérification par un alcool : en présence d'un acide fort**
 - Réaction utilisée pour séparer les aminoacides en phase gazeuse (et même en phase liquide) en produisant des dérivés esters butyliques.



A- Propriétés de la fonction carboxylique

- **Formation d'amide (liaison peptidique):** synthèse peptidique (lier le carboxyle d'un aminoacide avec l'amine du suivant).



A- Propriétés de la fonction carboxylique

- **Réaction de décarboxylation : synthèse d'amine** (ex : histamine)
- Par voie chimique ou enzymatique

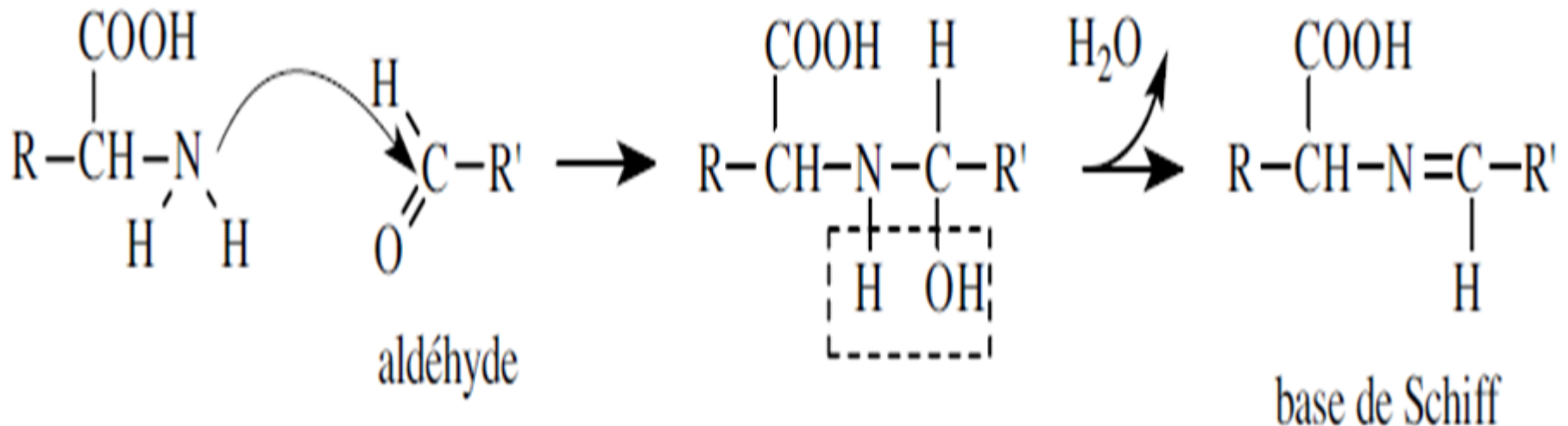


Exemple:

- **Sérine**: donne éthanolamine (précurseur de la choline)
- **Histidine** donne l'histamine (vasodilatateur intervenant dans les réactions d'allergie ou d'inflammation)
- **Acide glutamique** : donne 4-aminobutanoïque ou "GABA" (neurotransmetteur).

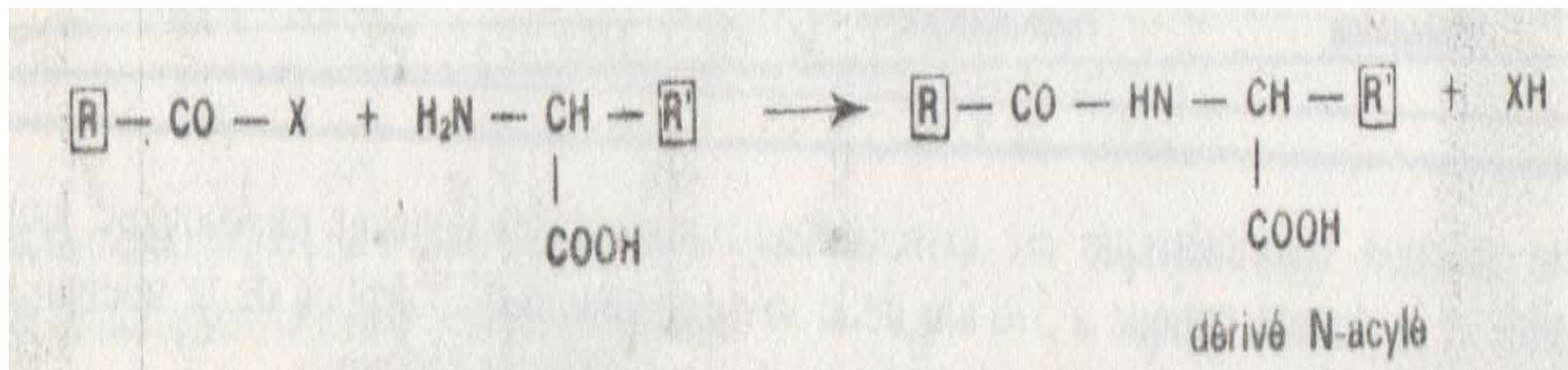
B- Propriétés liées au groupe NH₂

- Formation d'imine « base de Schiff » : réaction avec aldéhyde: *Addition de carbonyle*
- Sauf la proline qui contient une fonction amine secondaire.



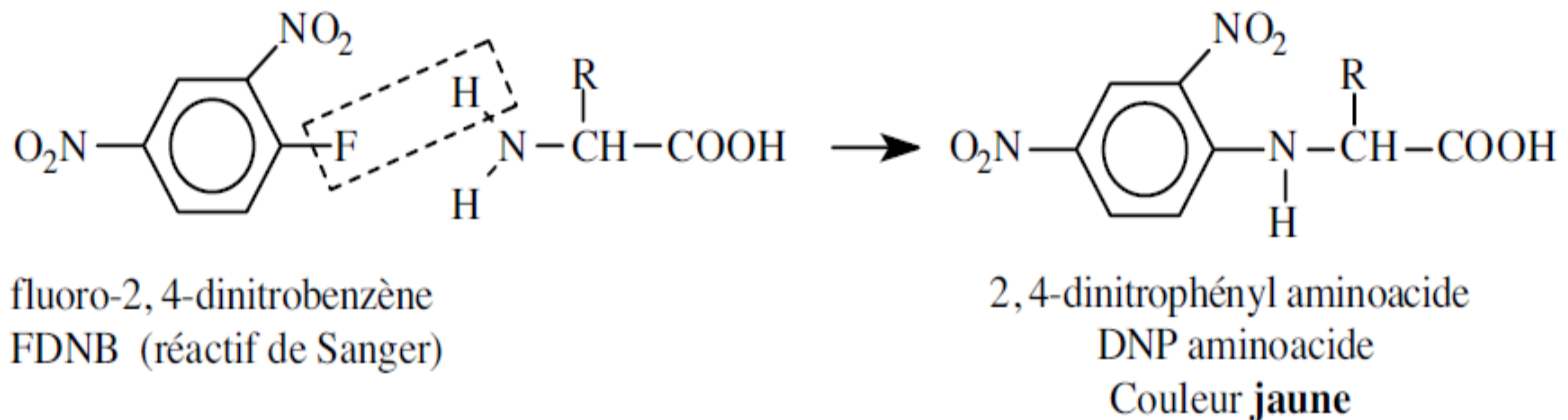
B- Propriétés liées au groupe NH2

- **N-Acylation**
- Avec des composés tels que les anhydrides d'acides ou des chlorures d'acide, les acides aminés forment des dérivés N-acylés



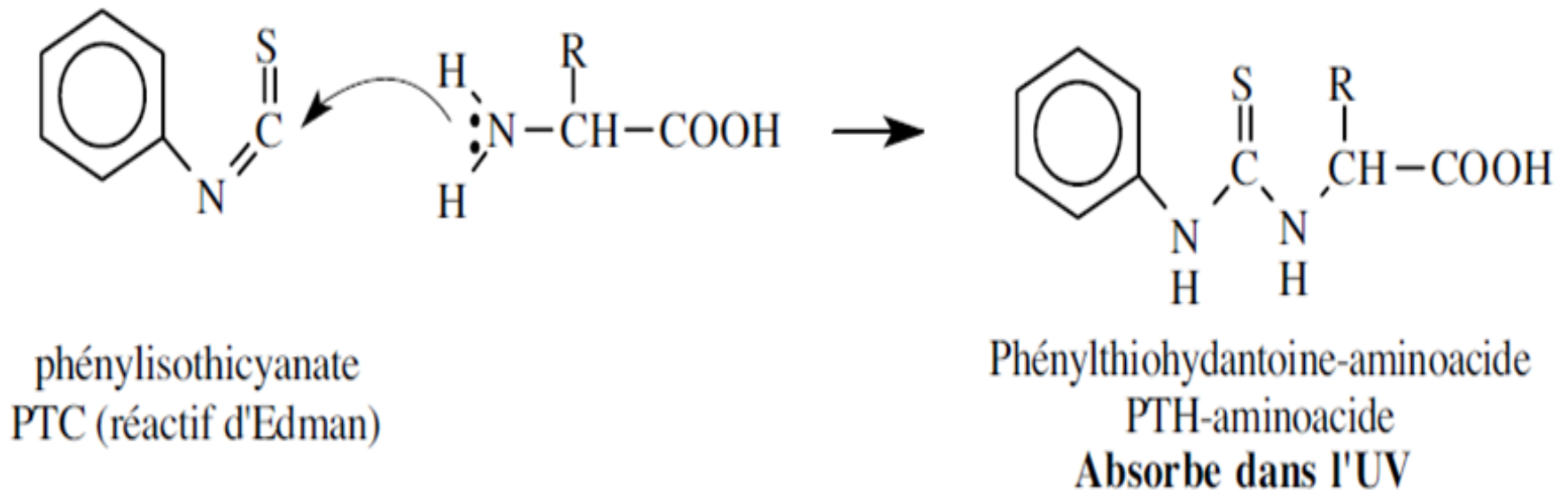
B- Propriétés liées au groupe NH2

- **Action du 1-fluoro 2,4- dinitrobenzène**
- Le FDNB réagit facilement avec les fonctions aminés pour former un dérivé N-2,4- dinitrophénylé.
- Ce composé jaune est facile à identifier par chromatographie et doser par spectrophotométrie à 360 nm.
- Cette réaction a permis à Frederik SANGER (1953) d'établir la première structure primaire d'une protéine : l'insuline.
- Réaction de Sanger



B- Propriétés liées au groupe NH2

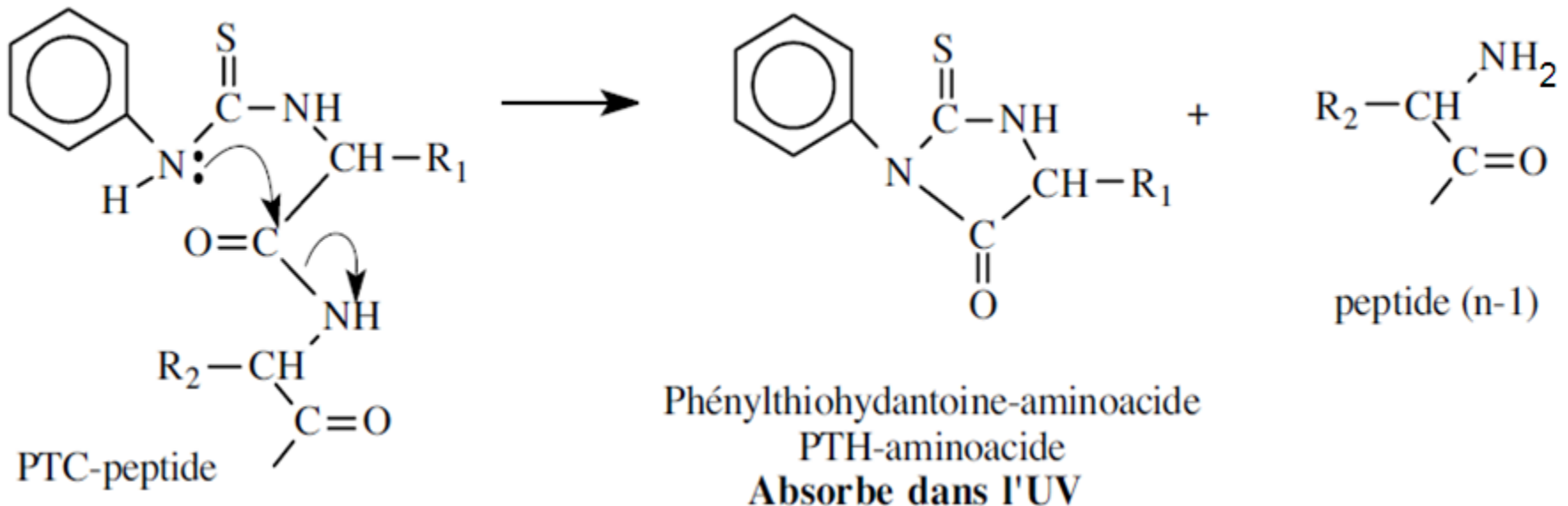
- **Action du phénylthiocyanate ou Carbamylation**
- La carbamylation avec le phénylthiocyanate (PTC), à un pH basique de 9, donne un dérivé phénylthiohydantoïne-aminoacide (**PTH**-aminoacide) qui absorbe dans l'UV et facilement séparable par chromatographie.



B- Propriétés liées au groupe NH2

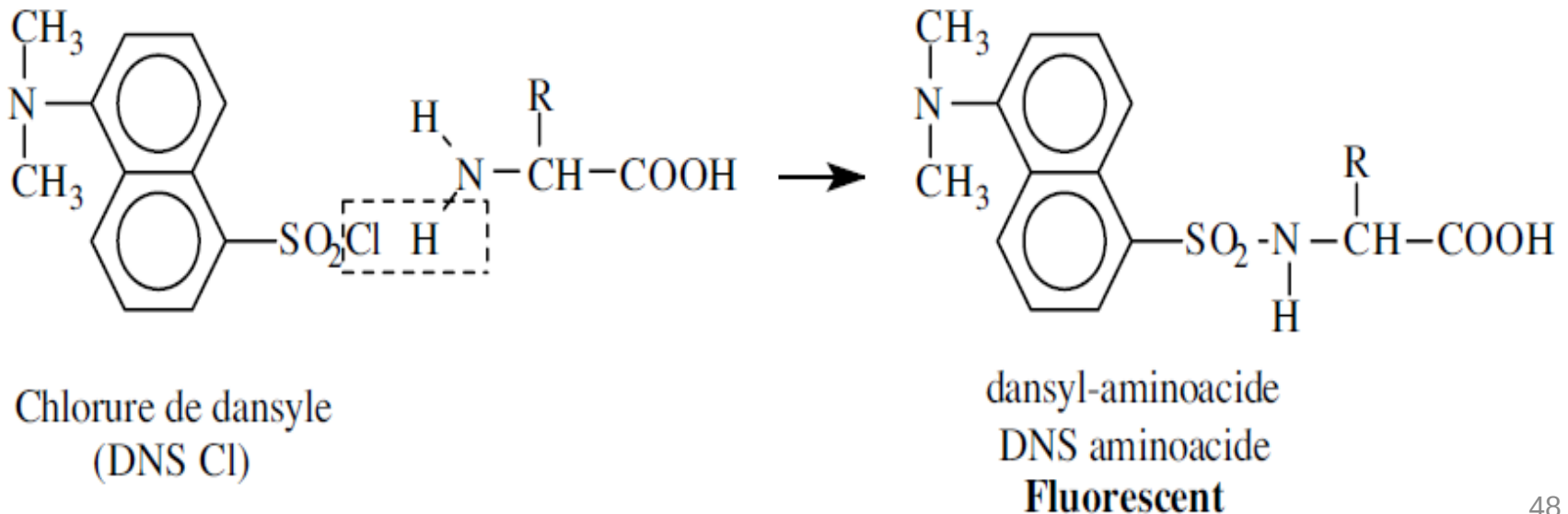
- **Carbamylation**

- La réaction avec l'Aa terminal d'une protéine (**n** Aa) libère un **PTH-aminoacide** et une protéine amputée de son Aa N-terminal ((**n-1** Aa) aminoacides:
- En répétant le processus, on peut déterminer la structure primaire de la protéine (**dégradation récurrente d'Edman**).



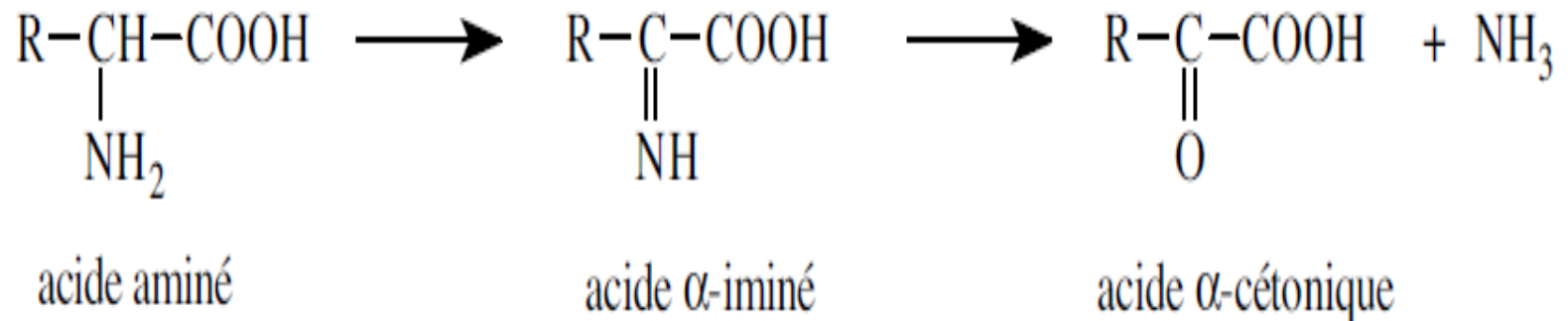
B- Propriétés liées au groupe NH₂

- **Dansylation**
- L'action du chlorure de dansyle (1-diméthyl-amino-naphtalène-5-sulfonyl) donne un DNS aminoacide stable et fluorescent



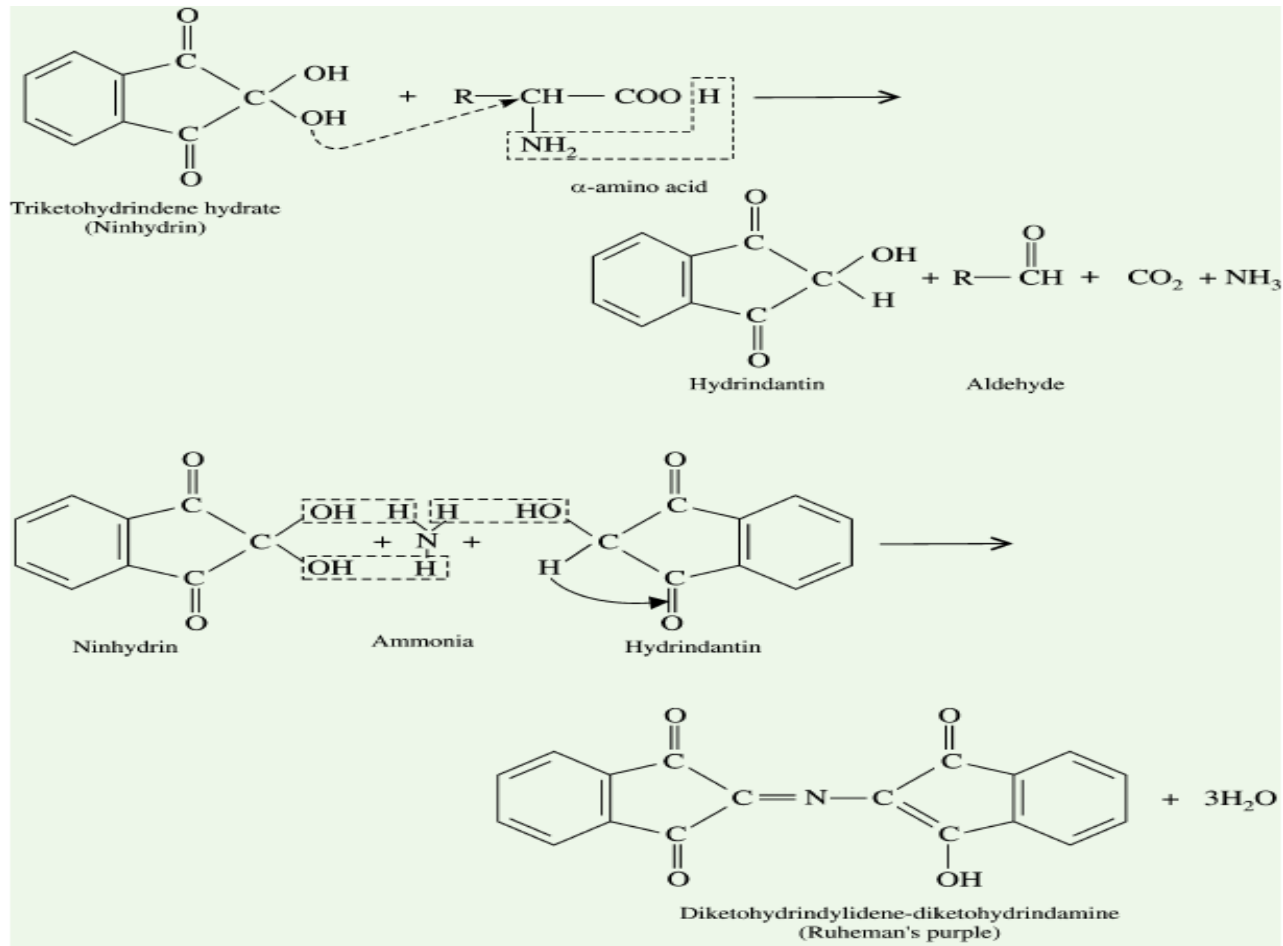
B- Propriétés liées au groupe NH₂

- **Désamination**
- Réaction au cours de laquelle, l'acide aminé perd son groupement sous forme de NH₃.



B- Propriétés liées au groupe NH₂

- La réaction avec la ninhydrine (++) connue et utilisée) donne un produit
 - violet pour les amines primaires
 - jaune pour les amines secondaires.



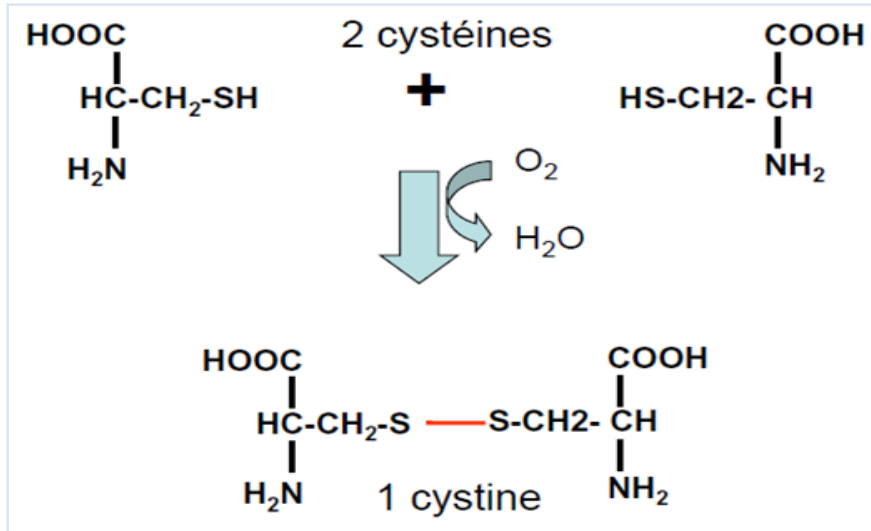
C- Propriétés de la chaîne latérale

Ces propriétés sont celles des fonctions portées par la chaîne latérale.

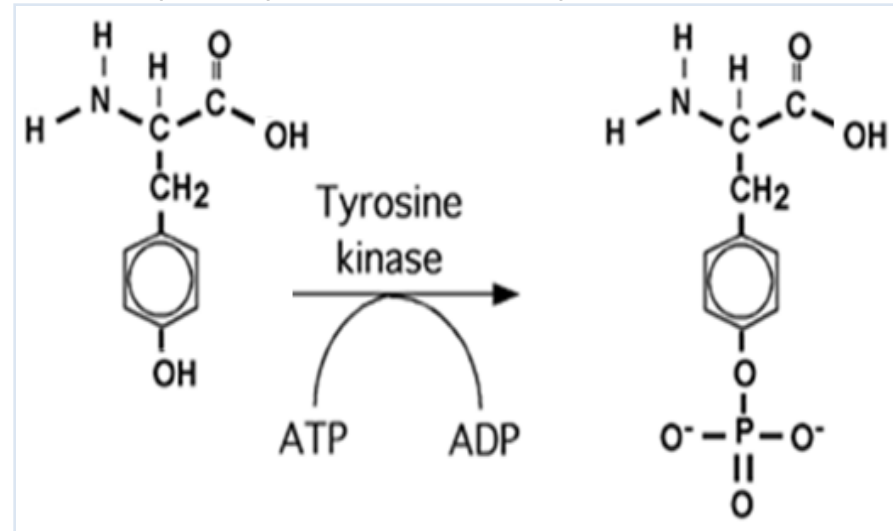
- **Groupe thiol**
 - Oxydation des SH : formation de ponts disulfures .
 - La cystéine peut être oxydée en cystine.
- **Fonctions alcool** de la sérine et la thréonine, la fonction phénol de la tyrosine aussi
 - Phosphorylation par l'acide phosphorique: formation d'un ester phosphate
 - O-Glycosylation
- **Fonctions amide**
 - N-Glycosylation

Réactions de la chaîne latérale

Formation de pont disulfure

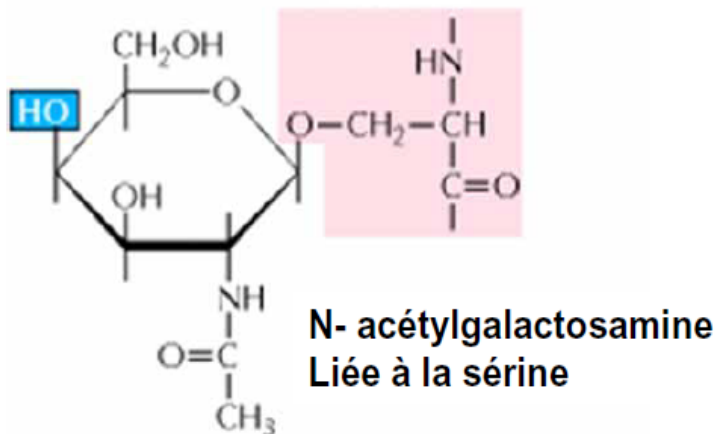


Phosphorylation de la tyrosine



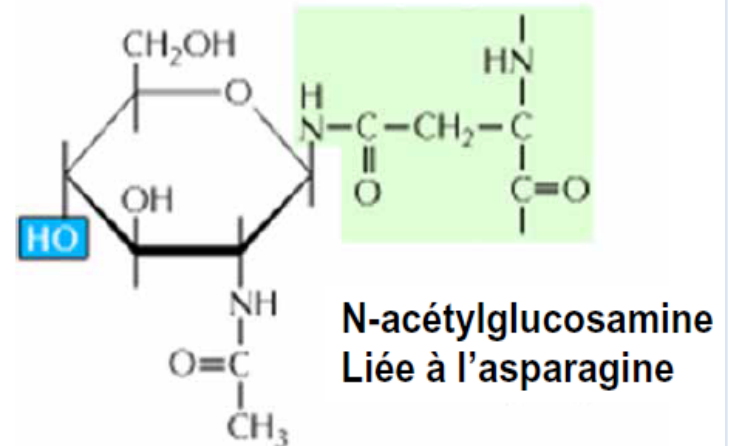
O-Glycosylation

Sérine



N-Glycosylation

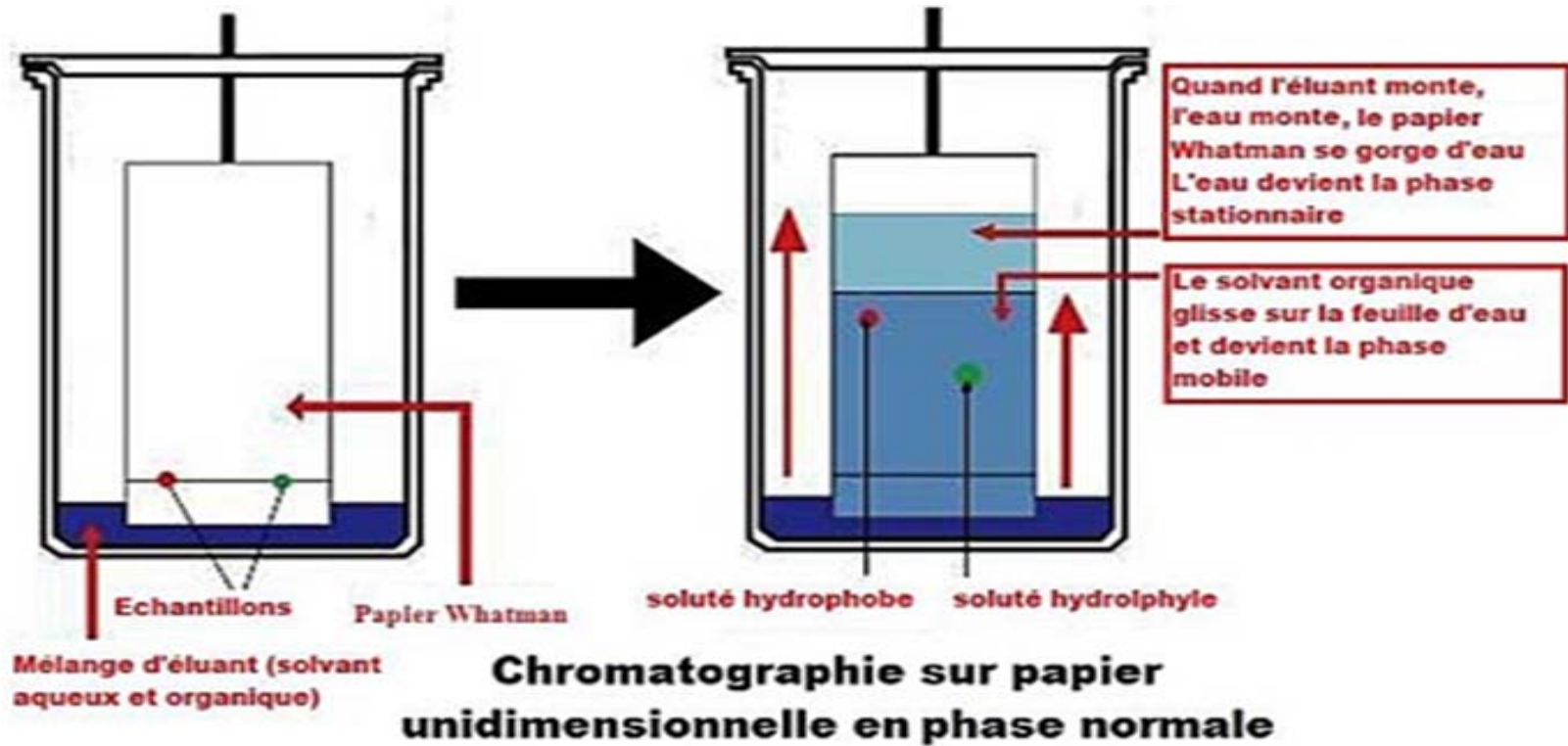
Asparagine



Méthodes d'étude des Acides aminés

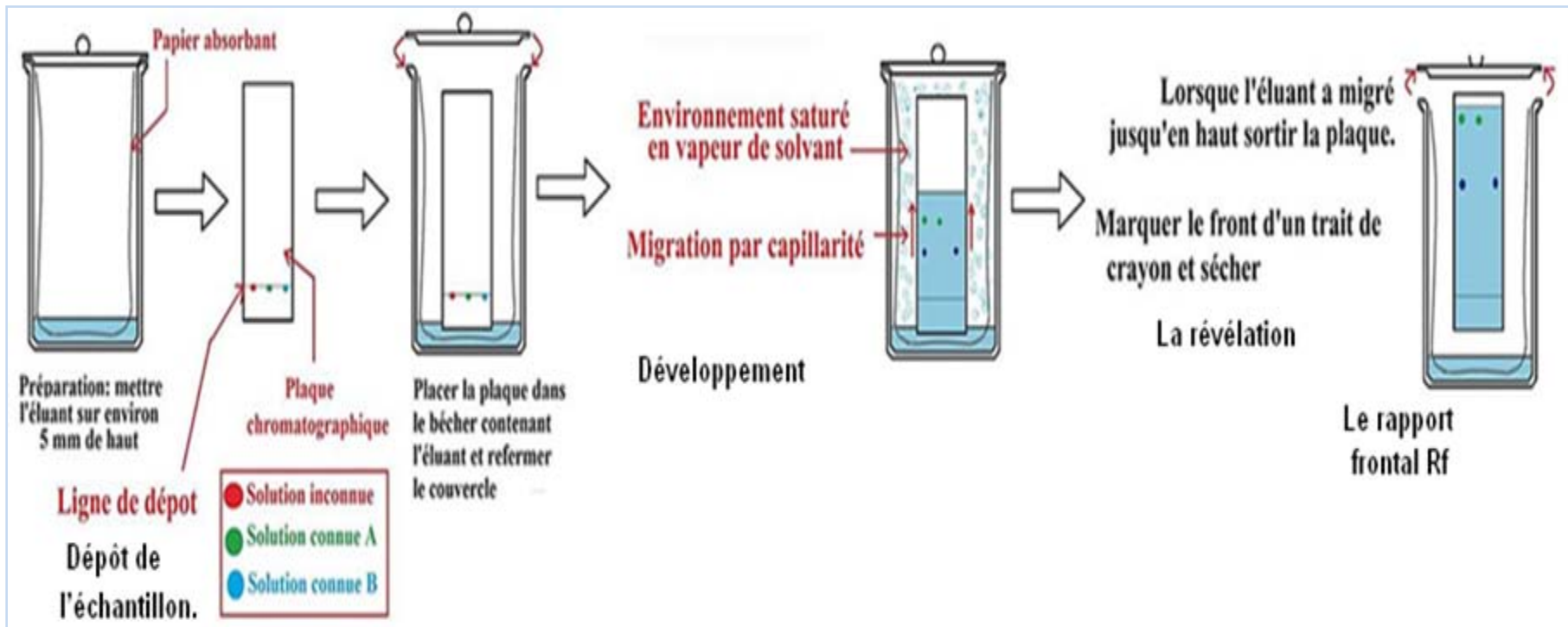
- Méthodes basées sur la solubilité
 - Chromatographie sur Papier
 - Chromatographie sur Couche Mince
 - Chromatographie en phase gazeuse
- Méthodes basées sur la charge
 - Electrophorèse
 - Chromatographie échangeuse d'ion
- HPLC

Chromatographie sur papier

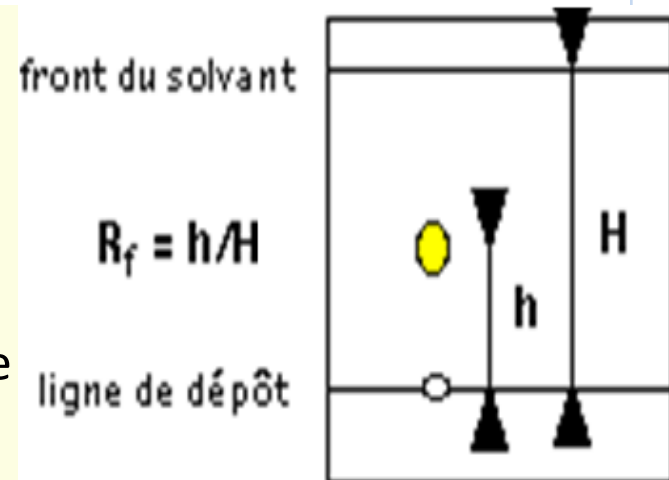


- Partage entre « phase hydrophile » et « phase hydrophobe ».
- Migration par capillarité: Les Aa hydrophobes migrent le plus
- Coloration par la ninhydrine
- L'identification des différents Aa du mélange se fait par comparaison avec des témoins, en calculant le R_f (rapport au front) de chaque soluté, ou le R_t (rapport à un témoin).

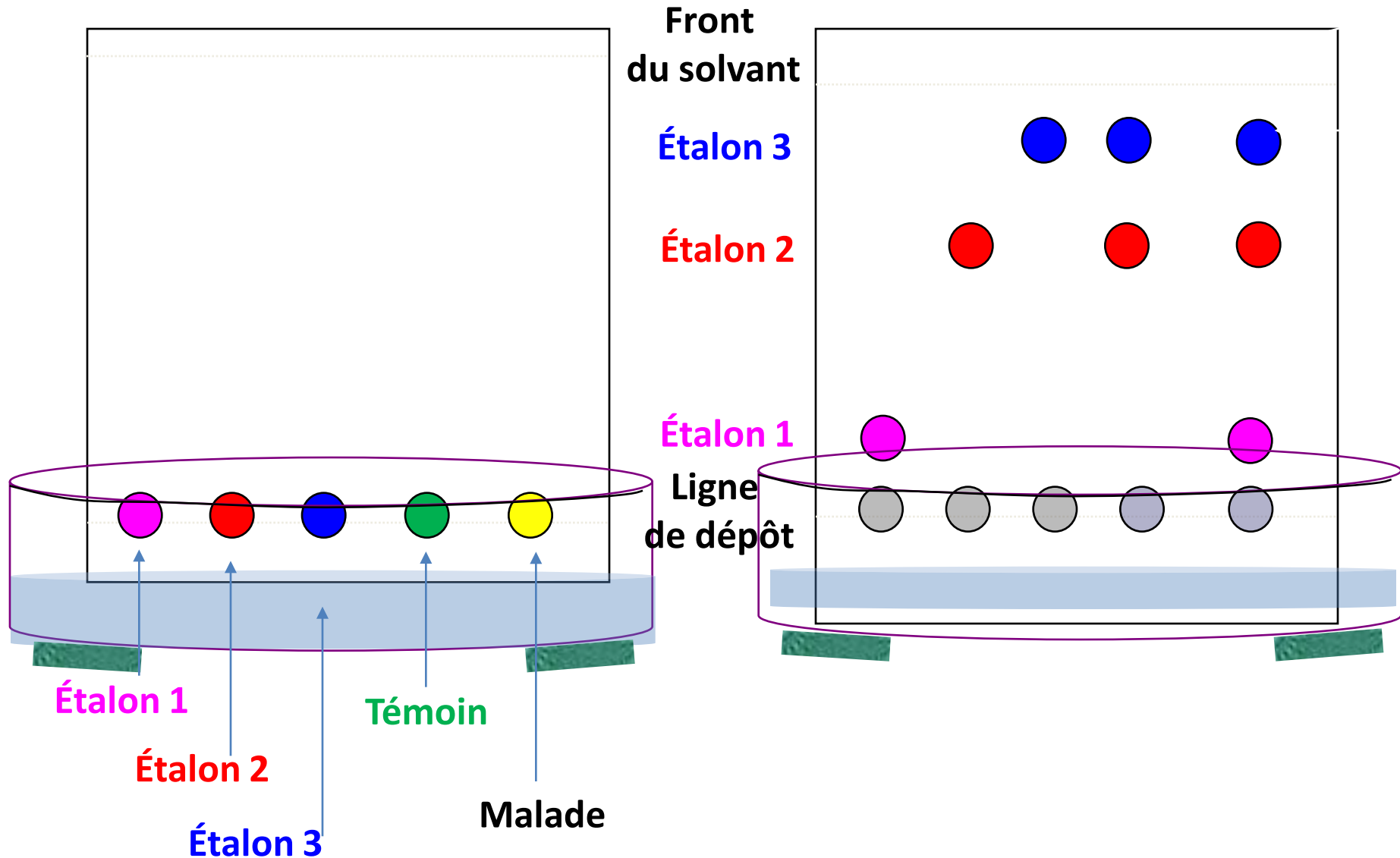
Chromatographie sur couche mince (CCM)



- Phase stationnaire: eau dans la couche
- Phase mobile: solvant
- Pour caractériser les composés = rapport:
 - distance parcourue par le soluté / distance parcourue par le solvant.
- Si soluté soluble dans la phase stationnaire = R_f faible
- Si soluté soluble dans la phase mobile = R_f vers 1.

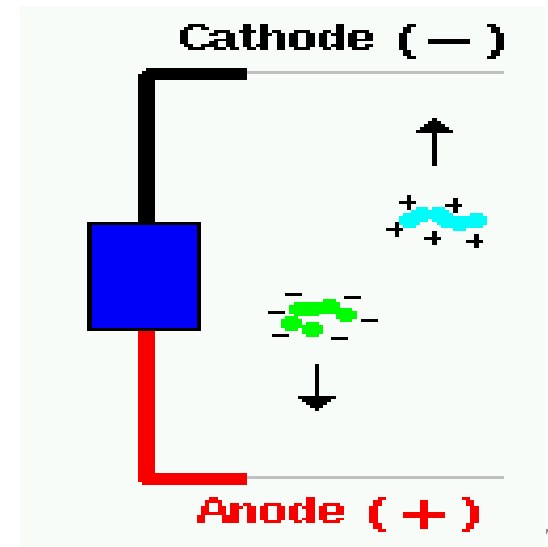
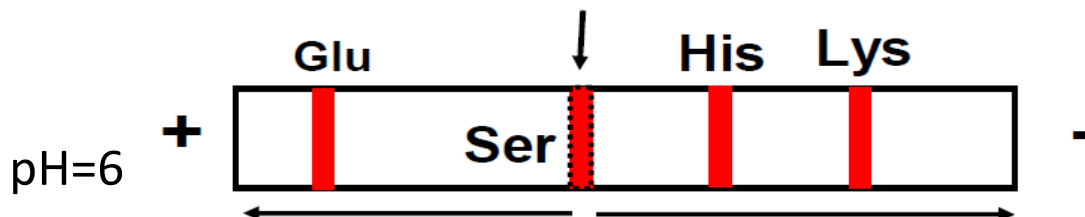
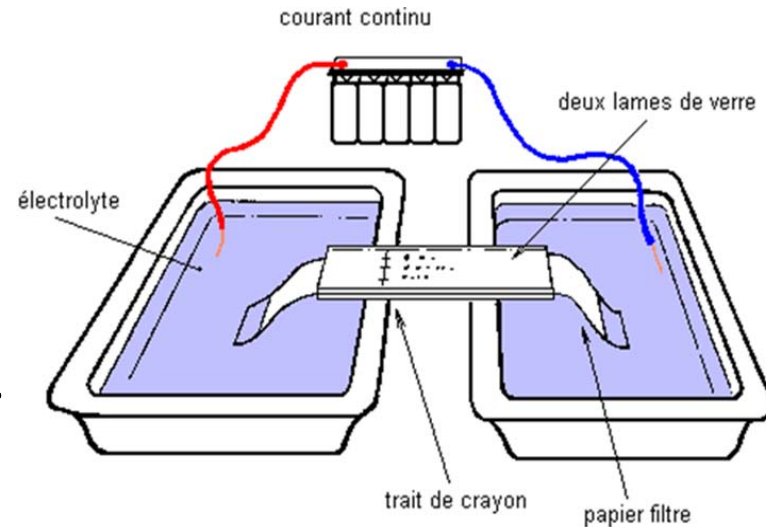


Chromatographie sur Paper



Electrophorèse

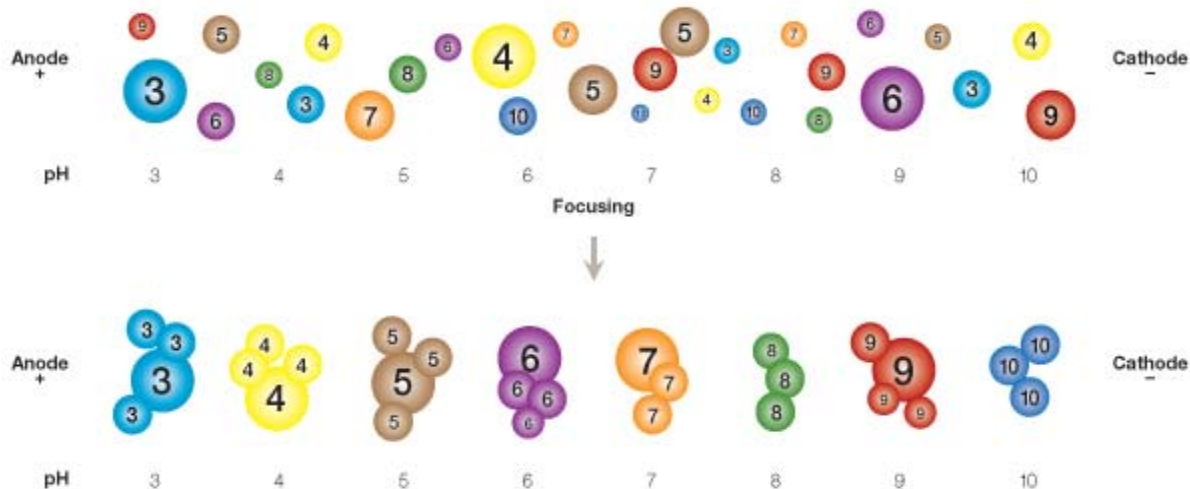
- À un pH donné, les Aa chargés électriquement peuvent exister en solution comme cations (+) ou anions (-).
- Un dépôt de l'Aa est placé au milieu du papier absorbant (humecté par une solution tampon).
- Le papier est connecté à deux électrodes (- et +).
- Lorsque le courant électrique est établi,
- Les cations se déplacent vers la cathode (-)
- et les anions se déplacent vers l'anode (+).
- La vitesse de chaque espèce migrante dépend du pH de la solution tampon et du point isoélectrique de l'acide aminé.
- Coloration (ninhydrine)



Electrofocalisation (IEF - IsoElectric Focussing)

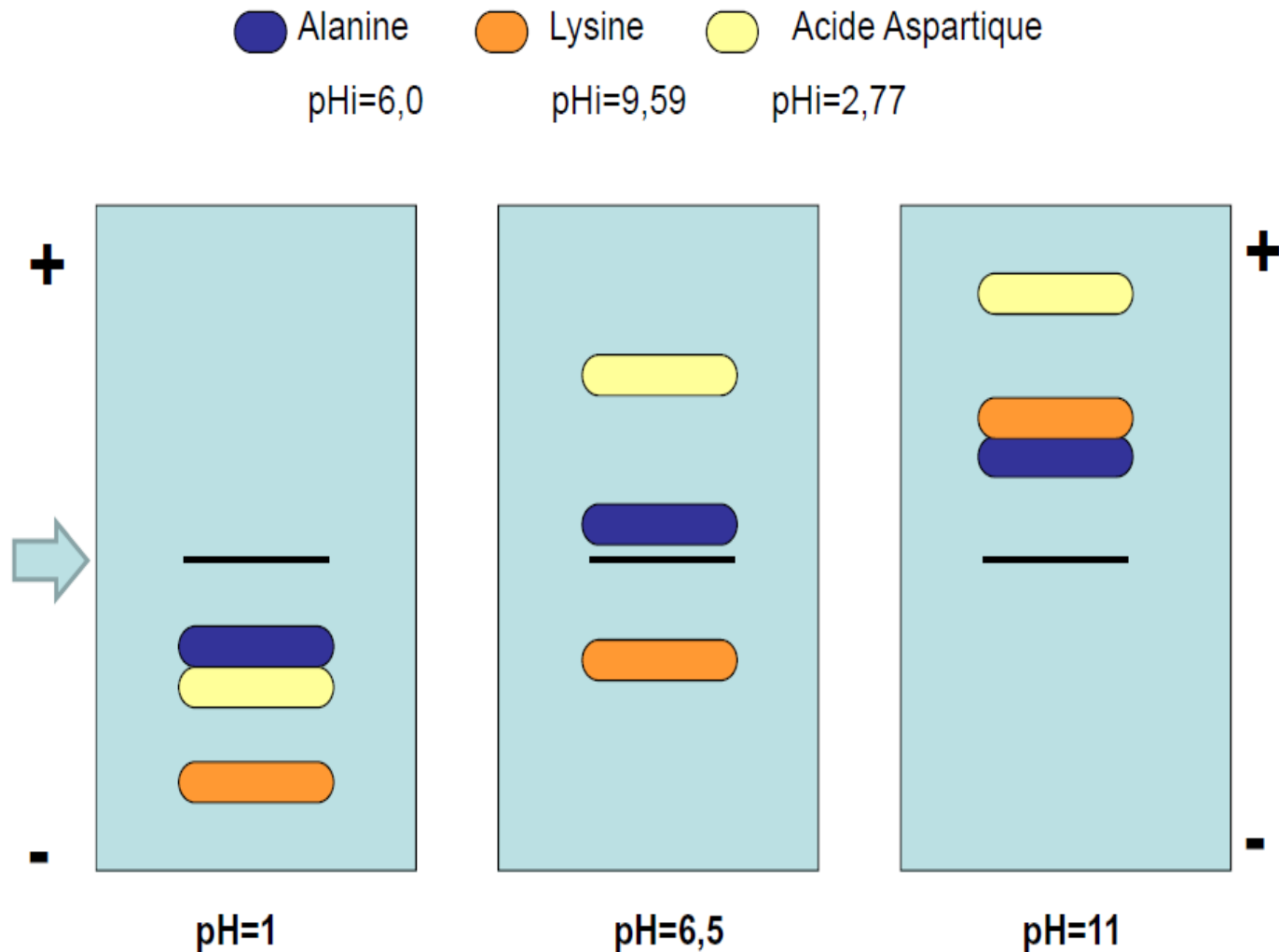
- La migration est effectuée dans un gradient de pH; chaque Aa migre jusqu'à l'endroit où le pH est égal à son pHi.
- Le gradient de pH est généré par des ampholytes, molécules amphotères de synthèse introduites dans le gel au moment de sa fabrication.
- Ces molécules migrent rapidement dans le gel jusqu'à atteindre une zone où leur charge devient nulle.

- Elles ont alors une distribution statistique telle qu'elles génèrent un gradient de pH sensiblement linéaire le long du gel



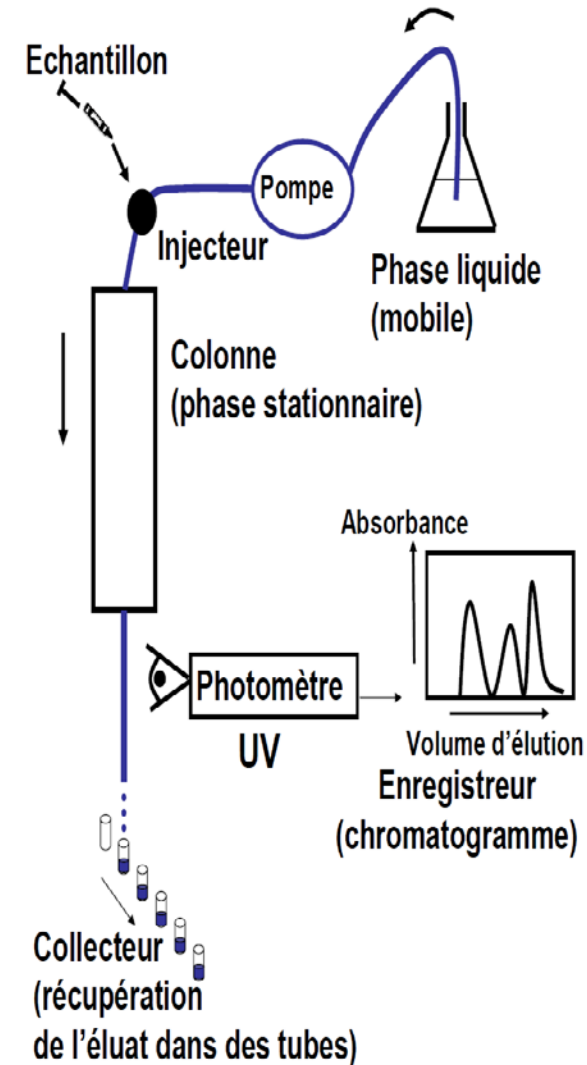
Isoélectrophorèse

Exemple de comportement en électrophorèse des acides aminés

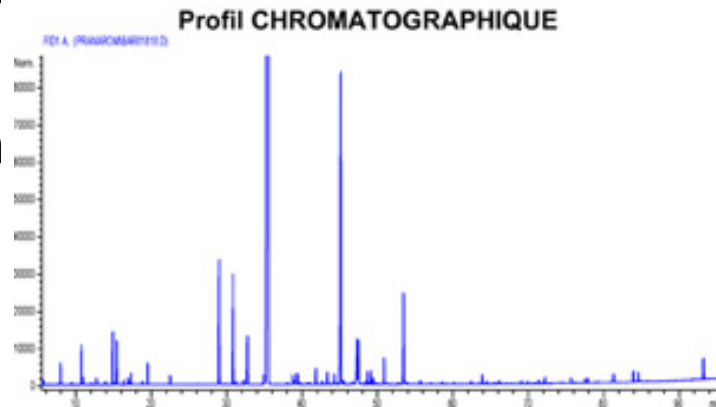
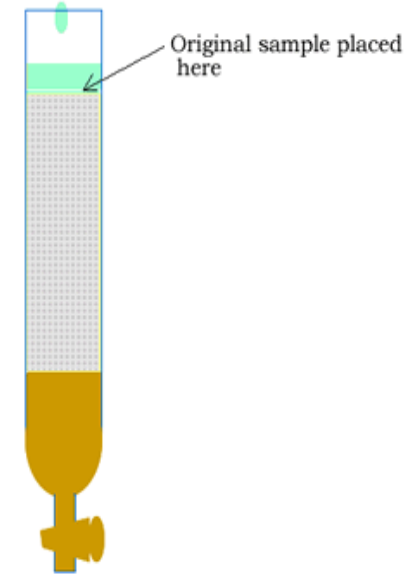
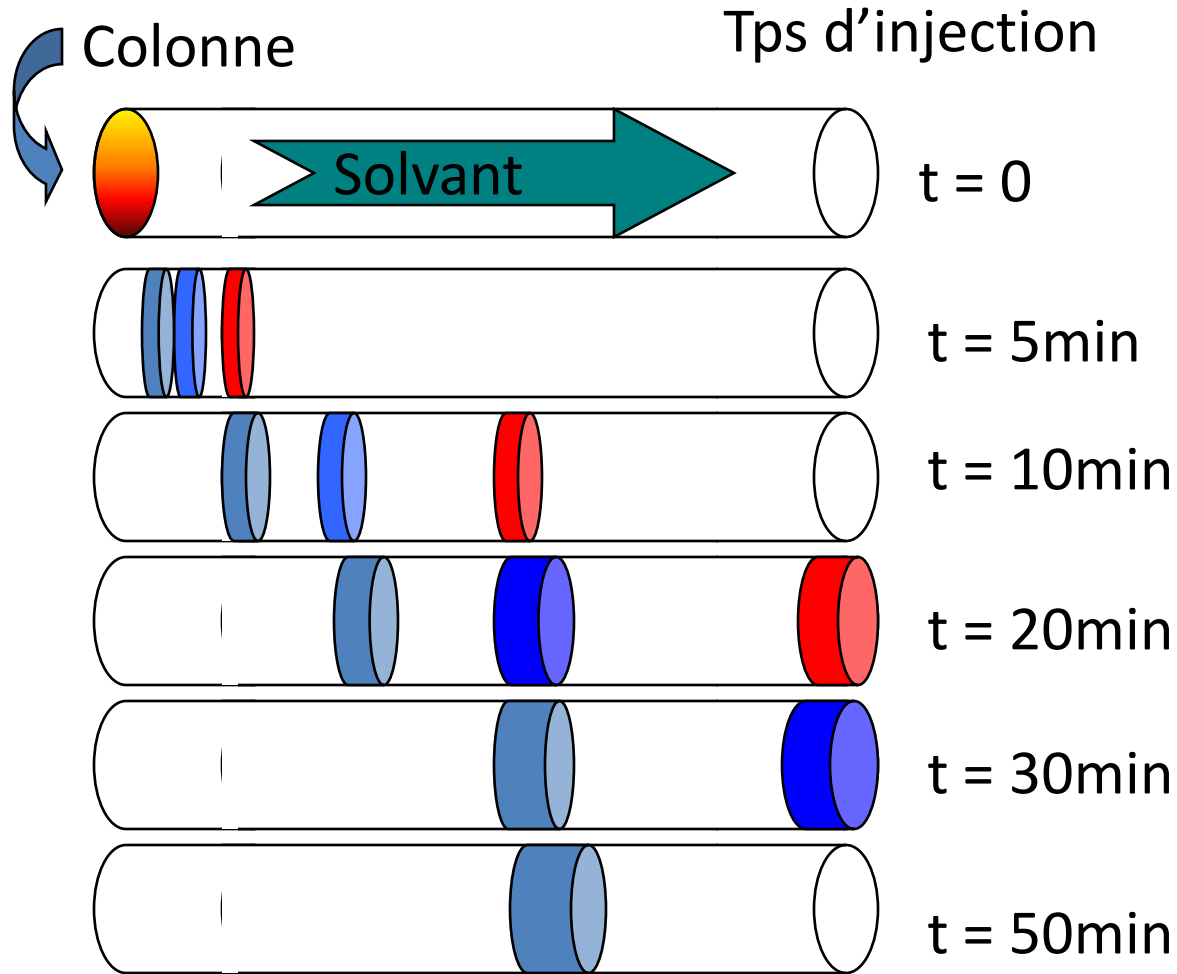


Chromatographie liquide sur colonne

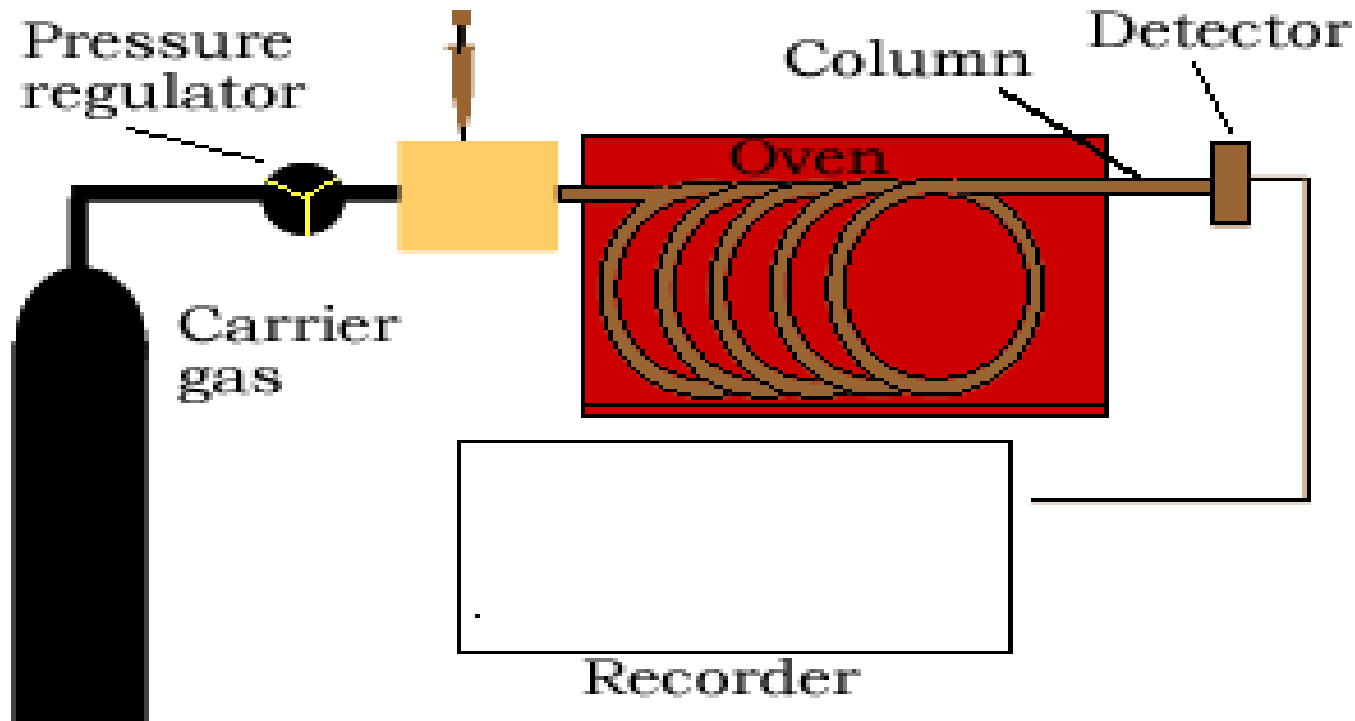
- Séparation des mélanges par suite d'équilibres entre une phase mobile et une phase stationnaire généralement solide.
- **Principe**
- La phase stationnaire, placée dans une colonne, est parcourue par la phase mobile. Les deux phases sont en contact intime.
- L'équilibre d'un mélange (qui se partage entre les deux phases en un endroit donné) est constamment déplacé par l'apport de liquide.
- Pour chaque constituant, le partage est différent, s'il est plus soluble, il s'enrichira dans la phase mobile et s'il est moins soluble, il s'enrichira dans la phase stationnaire.
- Donc séparation plus ou moins complète des constituants, qui, en sortiront de la colonne séparément.



Principe de la chromatographie sur colonne

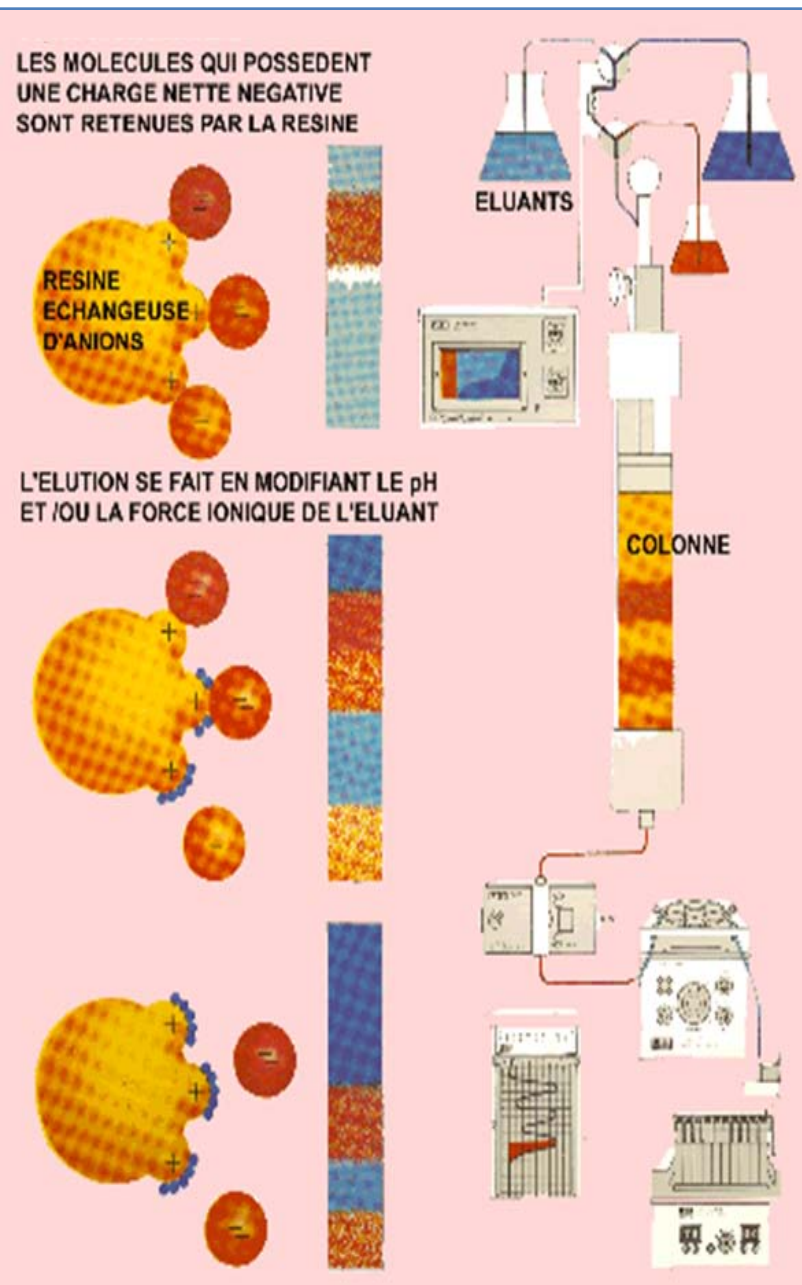


Chromatographie en phase gazeuse



- Séparation des mélanges gazeux par suite d'équilibres entre une phase gazeuse mobile et une phase stationnaire.
- Un mélange d'Aa à analyser est injecté et est vaporisé dans l'injecteur.
- Le gaz vecteur l'entraîne dans la colonne de séparation thermostatée.
- Les composés se répartissent différemment dans les 2 phases, se déplacent à des vitesses différentes puis sortent à des temps différents.
- A leur sortie, ils sont détectés et des pics apparaissent sur l'enregistreur.

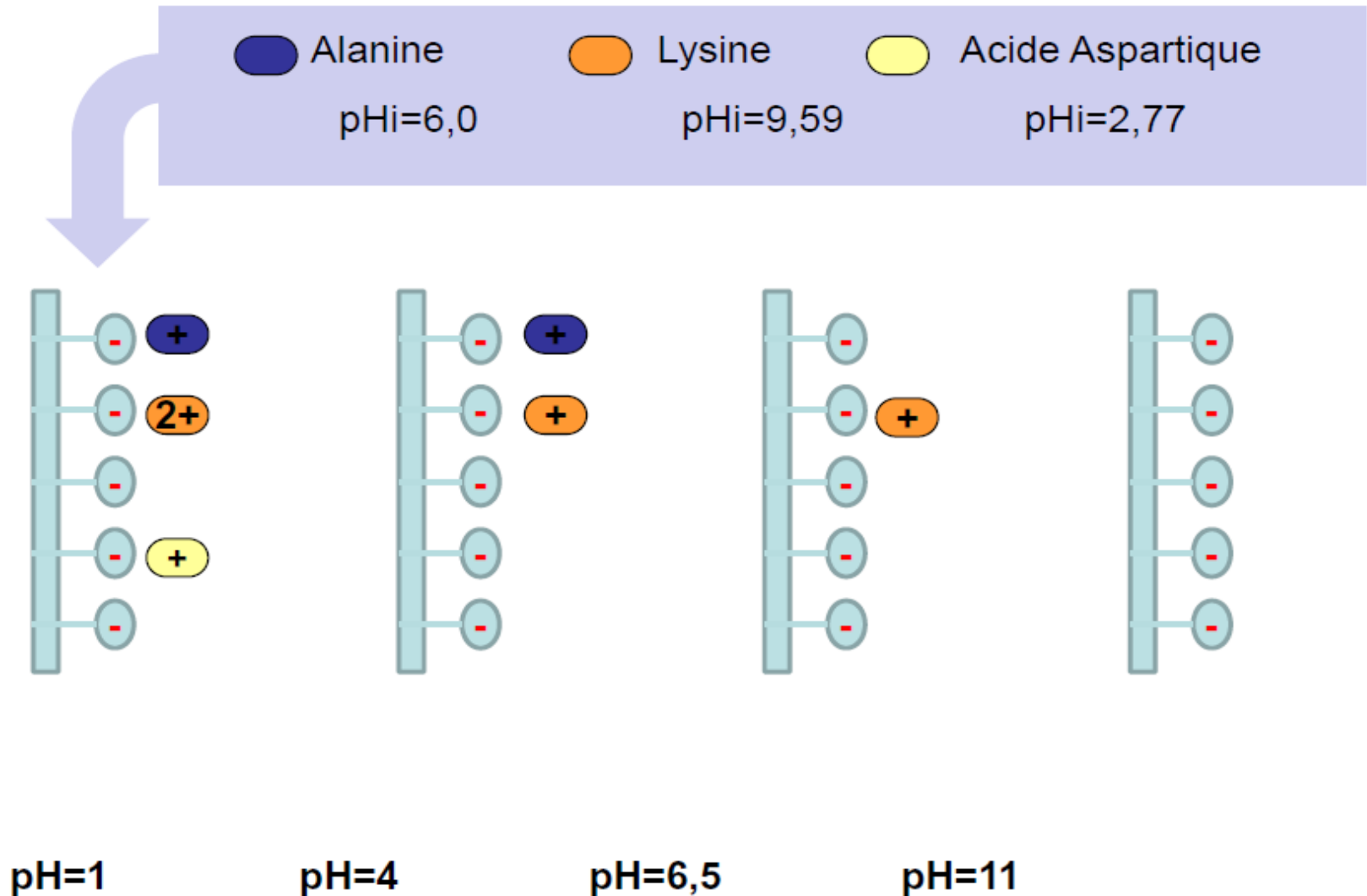
La chromatographie d'échange d'ions



- **Sur colonne échangeuse d'anion**
- Solution d'Aa (à séparer) à ce PH alcalin (Aa = s/f anion).
- Solution versée en haut d'une colonne rempli d'une résine chargé positivement.
- + l'Aa est chargé négativement, + il est retenu par cette résine, et + il migre lentement.
- Elution en diminuant le pH.
- Eluant = Solution de pH croissant.
- *Les AA se « décrochent » lorsque le pH atteint leur pHi.*
- Analyse de l'éluat contenant les AA séparés selon leur pHi « *Les plus basiques» sortent en premier*

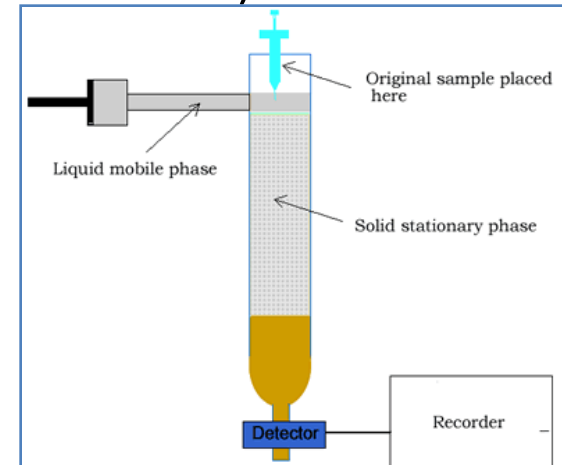
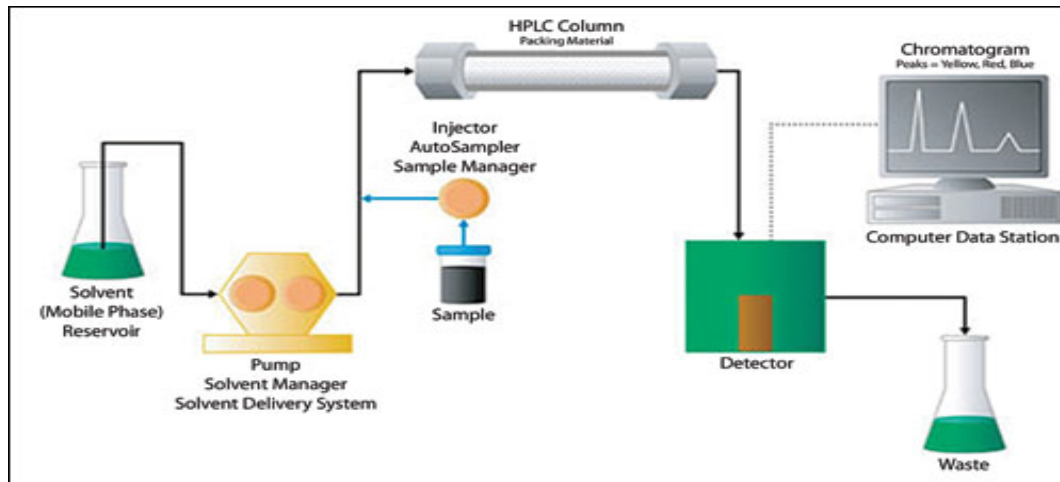
La chromatographie d'échange d'ions

Séparation d'un mélange Lys, Ala, Asp sur colonne d'échange de cations



HPLC: High Performance liquid chromatography

- chromatographie liquide « haute performance » C.L.H.P.
- **Principe**
- Le mélange d'Aa à analyser est poussé par un liquide (phase mobile) dans une colonne remplie de "grains" de très petite taille (phase stationnaire).
- La phase mobile est poussée par une pression élevée (grâce à des pompes à haute pression).
- Diminution du temps nécessaire de séparation des composants du mélange.
- Meilleure séparation des composants.
- Les pics obtenus sont plus étroits , bien séparés (meilleurs résolution)



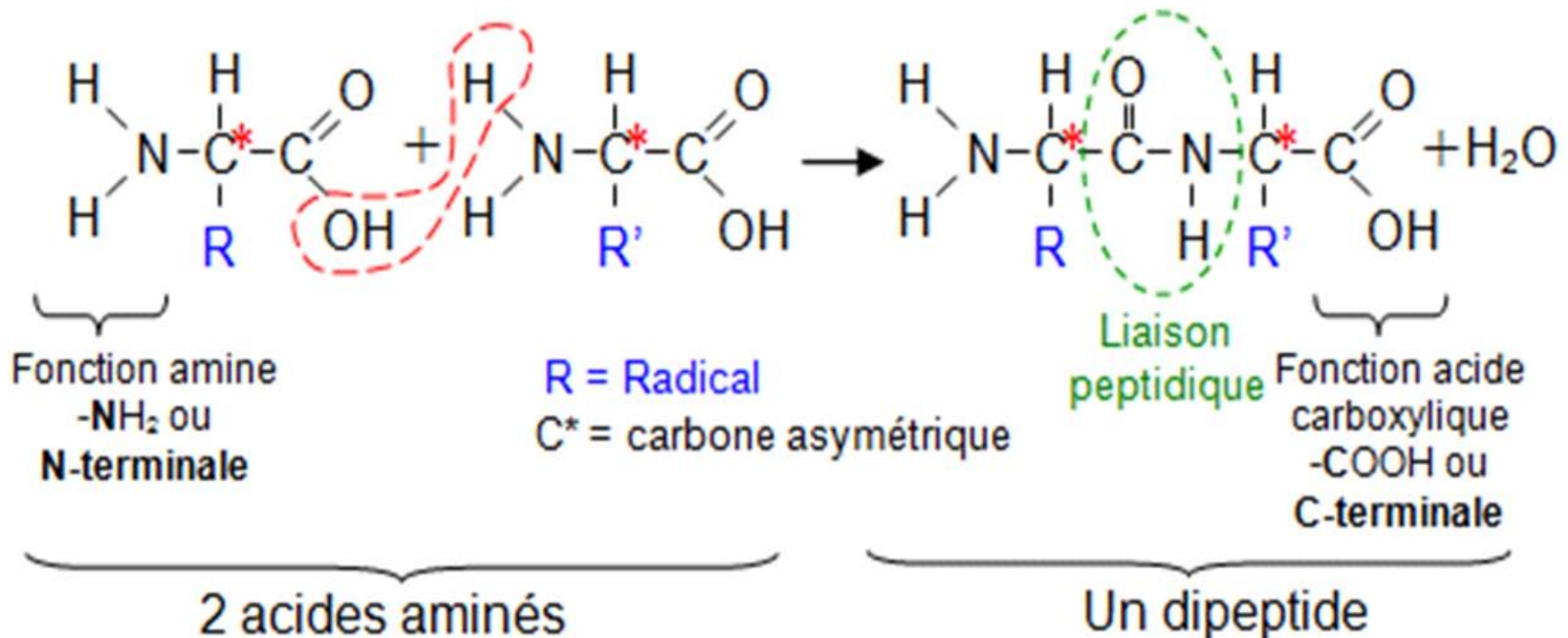
LES PEPTIDES

Plan

- **Définition de la liaison peptidique**
- **Caractéristiques de la liaison peptidique**
- **Nomenclature des peptides**
- **Mode de représentation d'une séquence peptidique**
- **Propriétés physiques des peptides**
- **Propriétés chimiques**
- **Propriétés biologiques**
- **Quelques exemples de peptides**

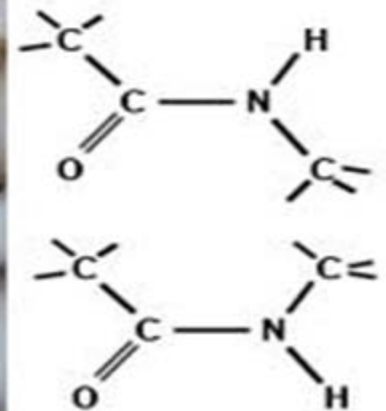
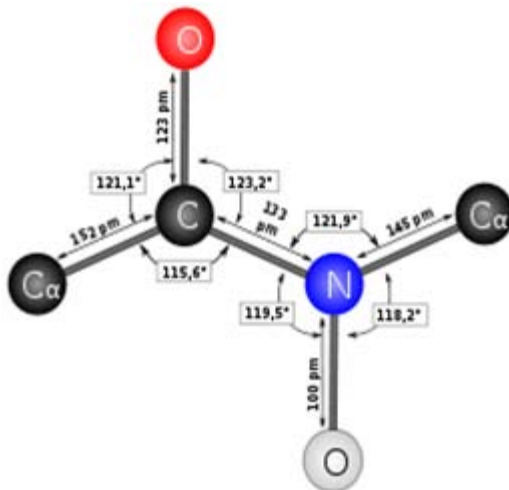
Définition de la liaison peptidique, généralités:

- La réaction du groupe carboxylique d'un acide aminé avec le groupement aminé d'un acide aminé suivant, permet de former un amide secondaire avec élimination d'une molécule d'eau.
- Cette liaison, s'appelle liaison peptidique, permettant la formation d'un dipeptide, etc...
- Un peptide: molécule comprenant au moins deux résidus d'Aa



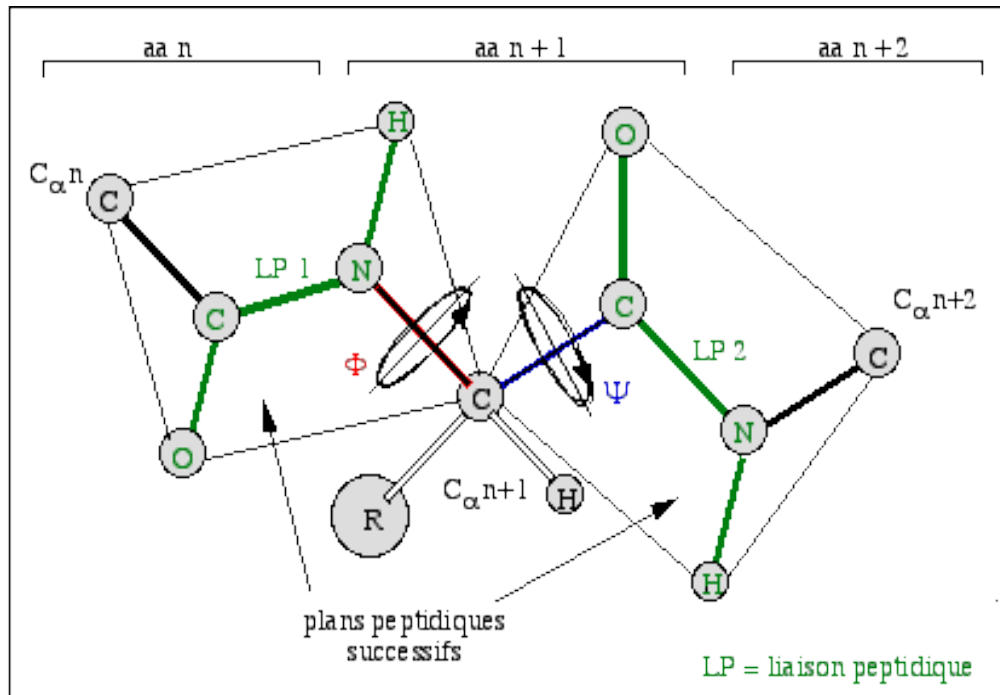
Caractéristiques de la liaison peptidique

- La liaison peptidique est une liaison qui a les caractéristiques d'une double liaison partielle, ce qui a trois conséquences (stable, rigide et plane) .
 - La distance entre les atomes de C et de N sont plus petite que dans une liaison simple, mais plus grande que dans une vrai double liaison.
 - La libre rotation autour de la liaison C-N est impossible (importance pour la conformation des protéines).
 - Les atomes qui participent à cette liaison (les 6 atomes C α , C, O, N, H et C α) se trouvent dans un même plan avec une disposition trans.

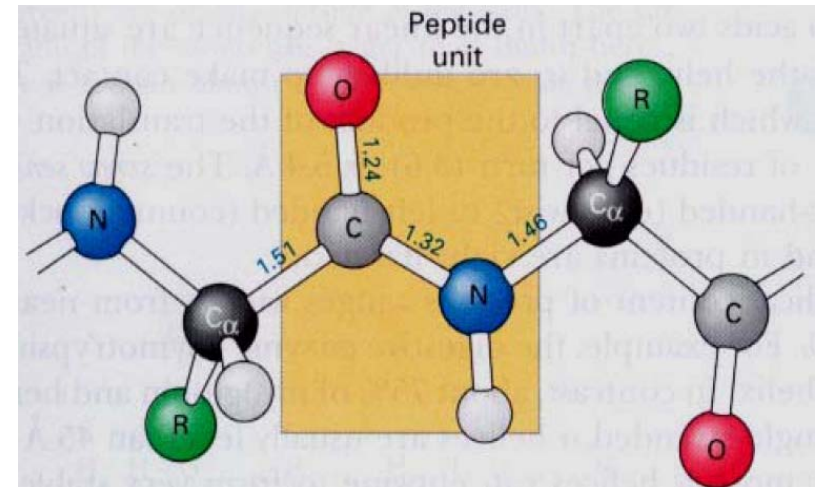


Caractéristiques de la liaison peptidique

Liaison peptidique dans un plan



Chaque plan comprend six atomes. Les plans sont articulés entre eux autour des carbones alpha par libre rotation : angle phi (Φ , C α -N) et psi (Ψ , C α -C) du même aa.

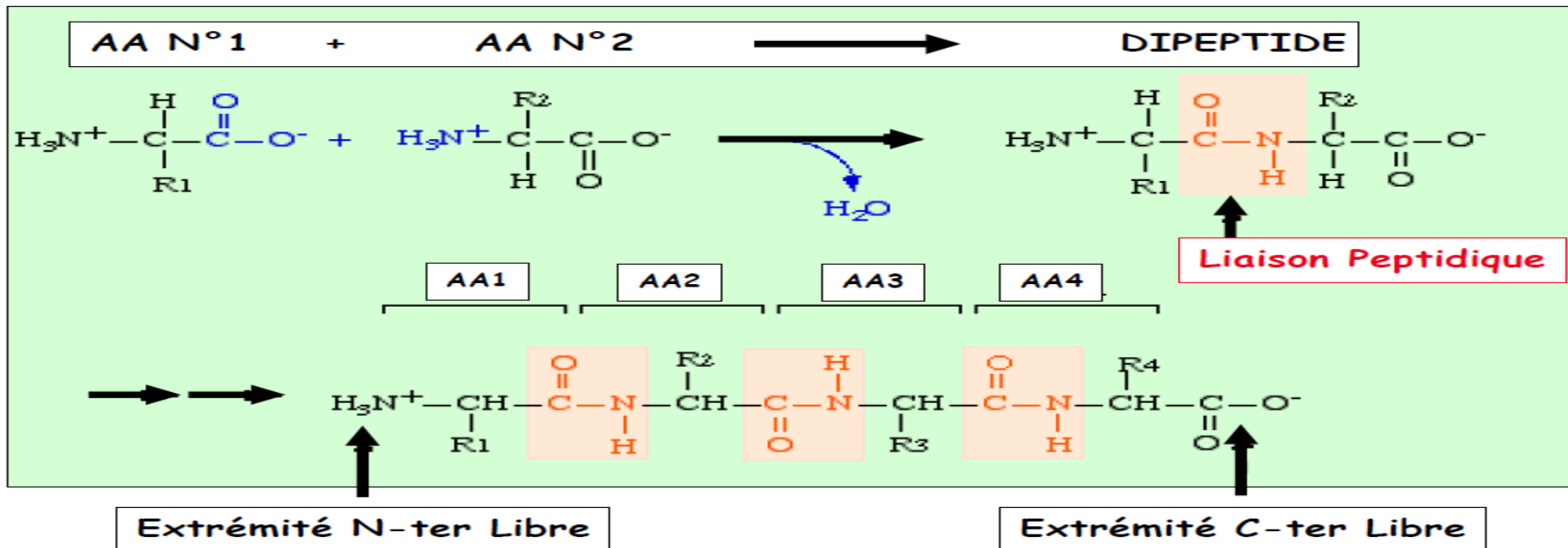


6 atomes (C•, C, O, N, H et C•) se trouvent dans un même plan.

Rotation possible des plans autour du

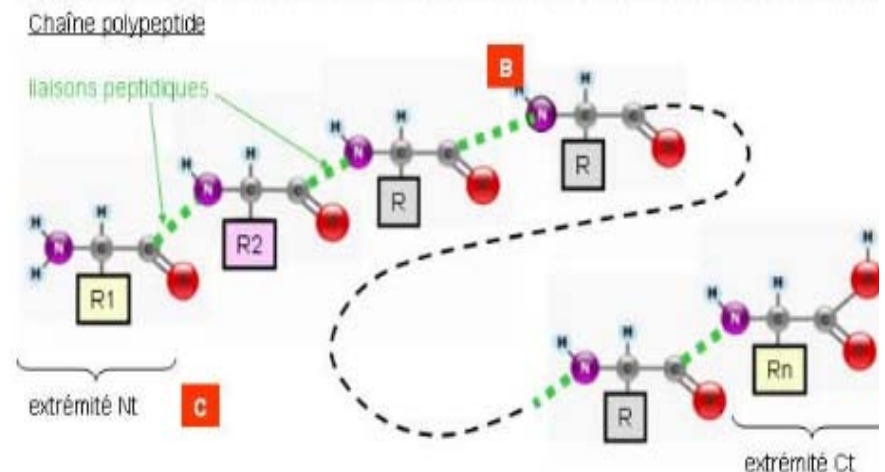
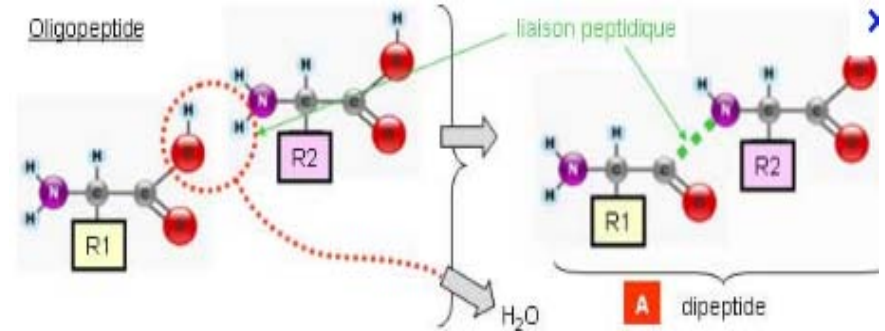
Mode de représentation d'une séquence peptidique:

- La chaîne qui comprend les liaisons amide est appelée la chaîne principale, alors que les substituants, R, constituent les chaînes latérales.
- Les peptides ont toujours une extrémité amine libre ou *extrémité N-terminale*, et une extrémité carboxyle libre ou *extrémité C-terminale*.



Nomenclature-Peptides

- La liaison peptidique; permet la formation d'un dipeptide avec deux amino-acides, tripeptide avec trois, polypeptide avec plus de quatre amino-acides.
- Une chaîne de 2 à 10 acides aminés est un oligopeptide (peptides contenant peu d'acides aminés).
- Des chaînes de 10 à 100 acides aminés : polypeptide.
- Les chaînes encore plus longues sont désignées comme des protéines (au-delà de 100)
- Deux ou plusieurs chaînes polypeptidiques peuvent être reliées par des ponts disulfure.

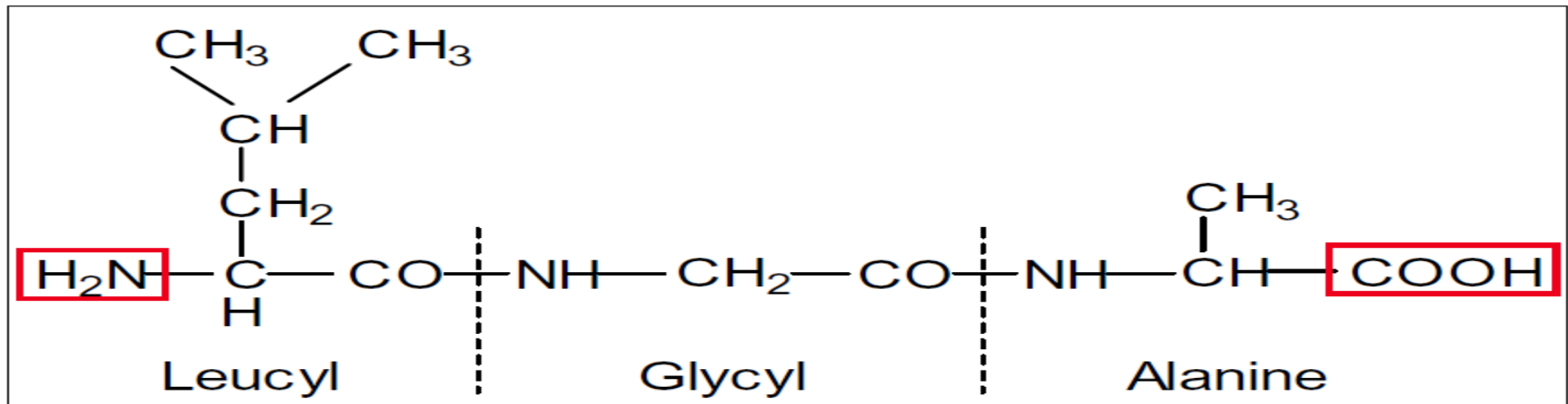


Exemple de chaîne polypeptidique : Chaîne A de l'insuline

D

Nomenclature des peptides

- Par convention, le nom du peptide commence toujours par la gauche, c'est-à-dire par l'extrémité N terminale, chaque acide aminé étant affecté du suffixe **-yl**, sauf pour le dernier qui garde son nom complet, sans suffixe.
- L'adjectif peptidique se rapporte aux peptides et notamment les liaisons des acides aminés qui les constituent.
 - Exp: le *leucyl- glycyl- alanine*.



Extrémité N-ter Libre

Extrémité C-ter Libre

Propriétés physiques des peptides

- Les peptides sont d'autant plus solubles dans l'eau qu'ils sont plus petits et contiennent d'avantage d'acide aminé hydrophile. (Sérine, acide aspartique)
- - Ils sont dialysable
- - Ils sont chargés : ils contiennent un groupement NH_3^+ (aminoterminal) et un groupement COO^- (C-terminal) et des groupements ionisables sur les chaînes latérales des résidus acides aminés
- - Ils se comportent comme un ion dipolaire et peuvent migrer dans un champ électrique.
- - Ils absorbent la lumière dans l'ultraviolet (λ : 220 à 230 nm ou à 280 nm s'ils contiennent un acide aminé aromatique)

Propriétés chimiques :

- Les peptides présentent les réactions chimiques de radicaux portés par les chaînes latérales des résidus d'acides aminés (les fonctions alcool peuvent être estérifiées par un phosphate ou un sulfate)
- Si le peptide contient un résidu de cystéine il peut former une liaison S-S : pont disulfure.
- Le plus petit peptide donne la même réaction que les acides aminés avec la ninhydrine.
- Le réactif de coloration biuret réagit avec les peptides contenant plus de 4 acides aminés.
- Hydrolyse de la liaison peptidique en présence d'HCl

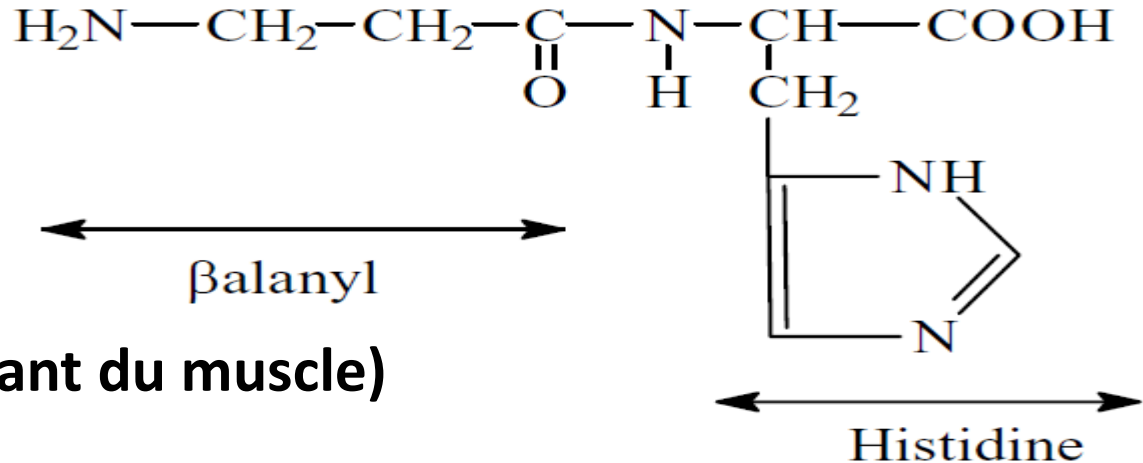
Propriétés biologiques

- La plus part des peptides sont formés comme les protéines par le système de synthèse protéique.
- *Certains peptides de petite taille se forment par réaction directe entre acides aminés grâce à la peptidyltransférase*
- Hydrolyse enzymatique des peptides se fait par les peptidases (digestives).
- Les rôles sont nombreux, mais on peut citer :
 - Les peptides hormonaux
 - Les peptides de structure
 - Les peptides antibiotiques
 - Tous les pénicillines contiennent la D penicillamine qui est le dérivé du diéthyle de la D- cystéine.
 - Beaucoup d'antibiotiques utilisés en thérapeutique sont des peptides synthétisés en laboratoire.

Peptides

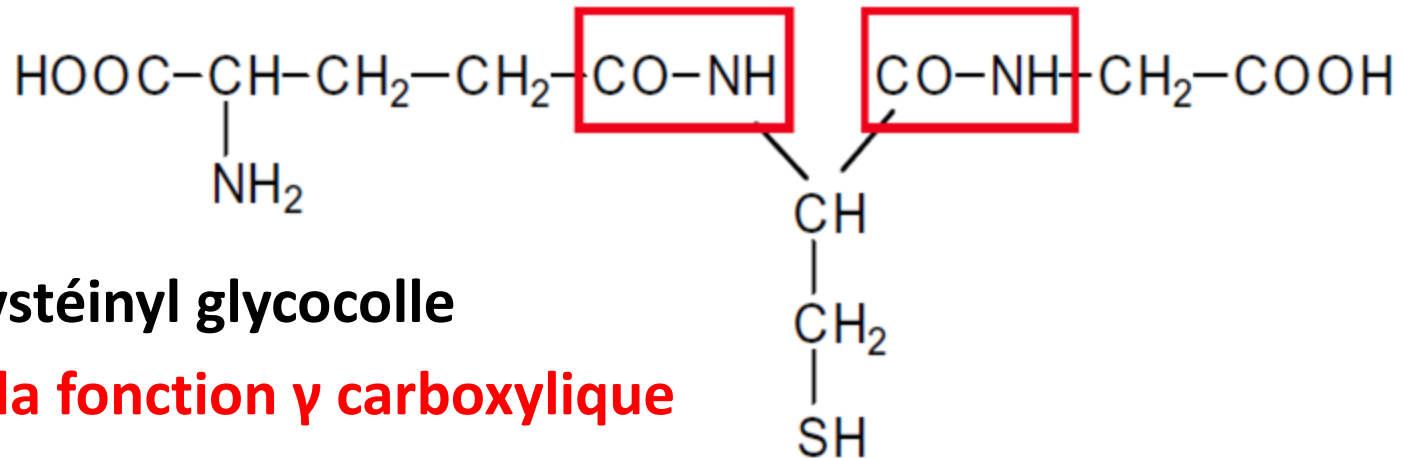
- Dipeptide

- Carnosine: (constituant du muscle)
- β alanyl histidine

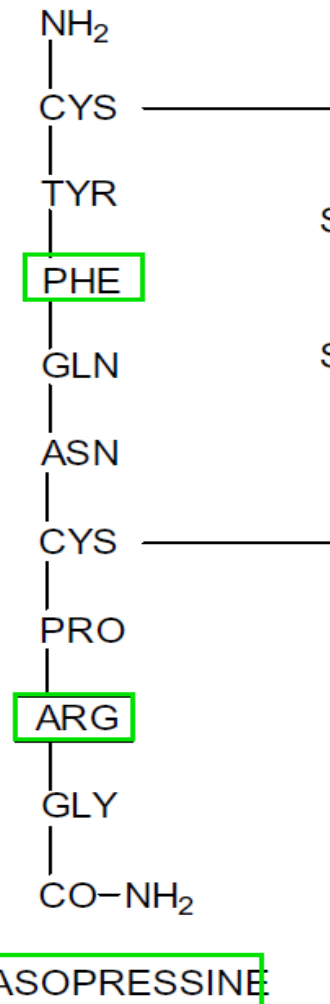
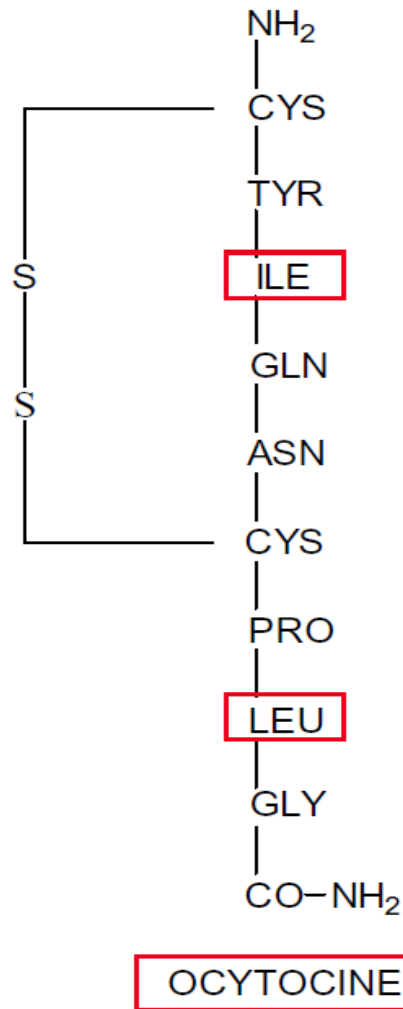


- Tripeptide

- Glutathion:
- γ glutamyl cystéinyl glycocolle
- Liaison avec la fonction γ carboxylique



Peptides

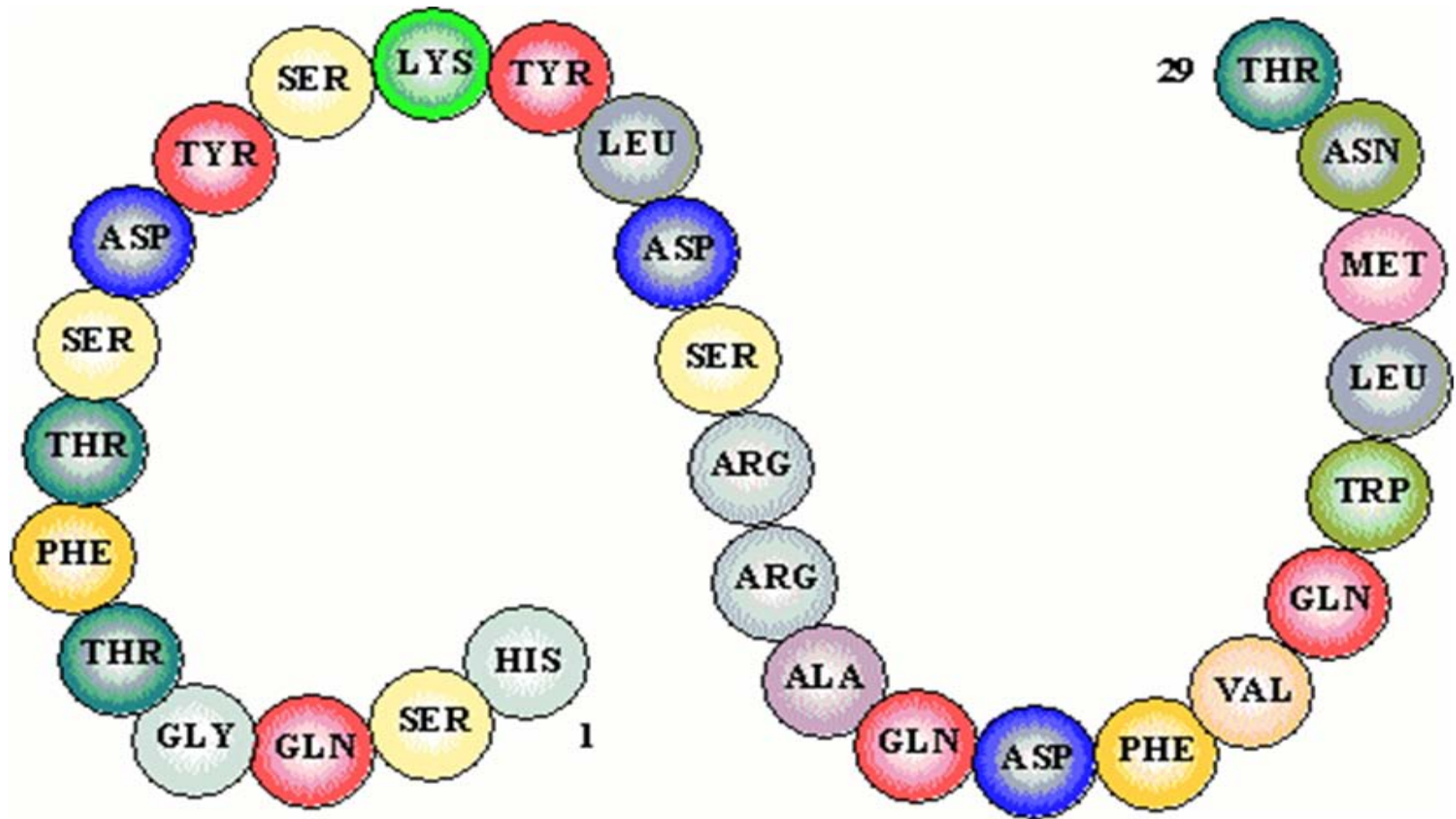


Pont Disulfure

AA Cter: glycineamide
NH₂-CH₂-CO-NH₂

- Hormones hypothaliques: 9 AA

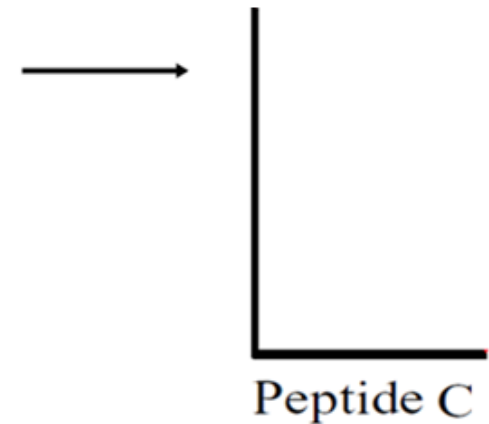
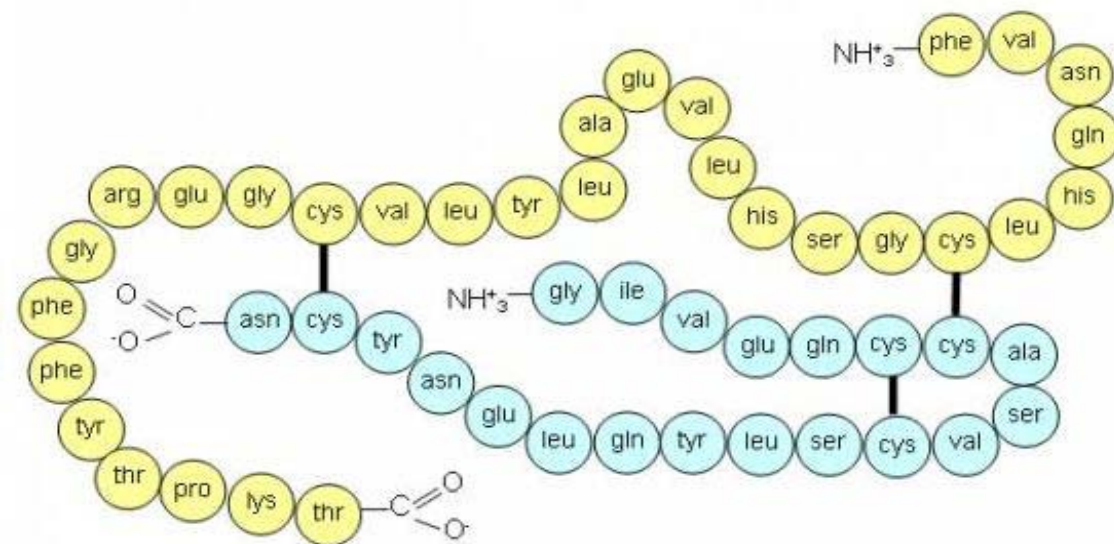
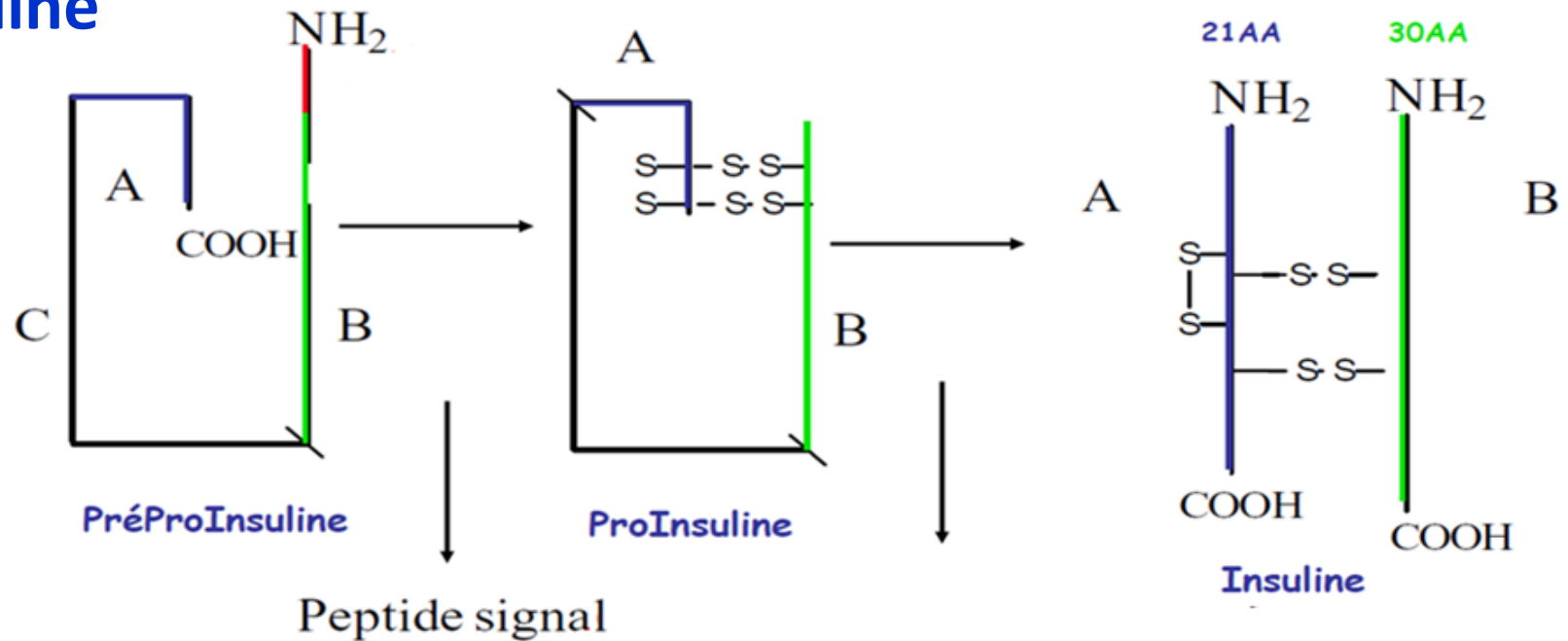
Peptides



Glucagon: 29 AA. Hormone pancréatique: Chaîne monocaténaire.

Peptides

Insuline



LES PROTEINES

Plan

- **Définition**
- **Caractéristiques des protéines**
- **Structure tridimensionnelle des protéines**
 - **Structure primaire**
 - **Structure secondaire**
 - **Hélice α**
 - **Feuillet plissé β**
 - **Coude β**
 - **Structure tertiaire**
 - **Structure quaternaire**
- **Les différents types de liaisons ou forces impliquées dans la structuration des protéines**

Définition

- Les protéines sont une classe de molécules biologiques « de première importance » (du grec *proteios*).
- Ce sont des **macromolécules** de type **polymère** composée d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés (chaines polypeptidiques). .
- Les protéines (ou les protides) sont des éléments essentiels car elles ont des **rôles très variés** au sein d'une cellule et au sein d'un organisme:
 - un rôle structurel (l'actine),
 - un rôle catalytique (les enzymes),
 - un rôle de régulation de l'expression des gènes (les facteurs de transcription), etc.

Caractéristiques des protéines

- Chaque protéine, présente dans les cellules, a une structure qui est déterminée **génétiquement** et donc, possède une taille prédéfinie (**modifiée parfois après traduction**).
- Dans une cellule, chaque protéine joue un rôle particulier.
- Les protéines sont synthétisées et dégradées en permanence dans les cellules.

Caractéristiques des protéines

- Une protéine est
 - **Monomérique** = une seule chaîne peptidique
 - **Multimérique** = plusieurs chaînes peptidiques.
 - **Homomultimérique** = plusieurs chaînes peptidiques identiques
 - **Hétéromultimérique** = plusieurs chaînes peptidiques différentes.
 - **Une holoprotéine** quand elle ne fournit que des acides aminés, après hydrolyse.
 - **Une hétéroprotéine** quand elle fournit des acides aminés et d'autres molécules différentes, après hydrolyse.
 - La partie protéique: apoprotéine
 - La partie non protéique: groupement prosthétiques

Caractéristiques des protéines

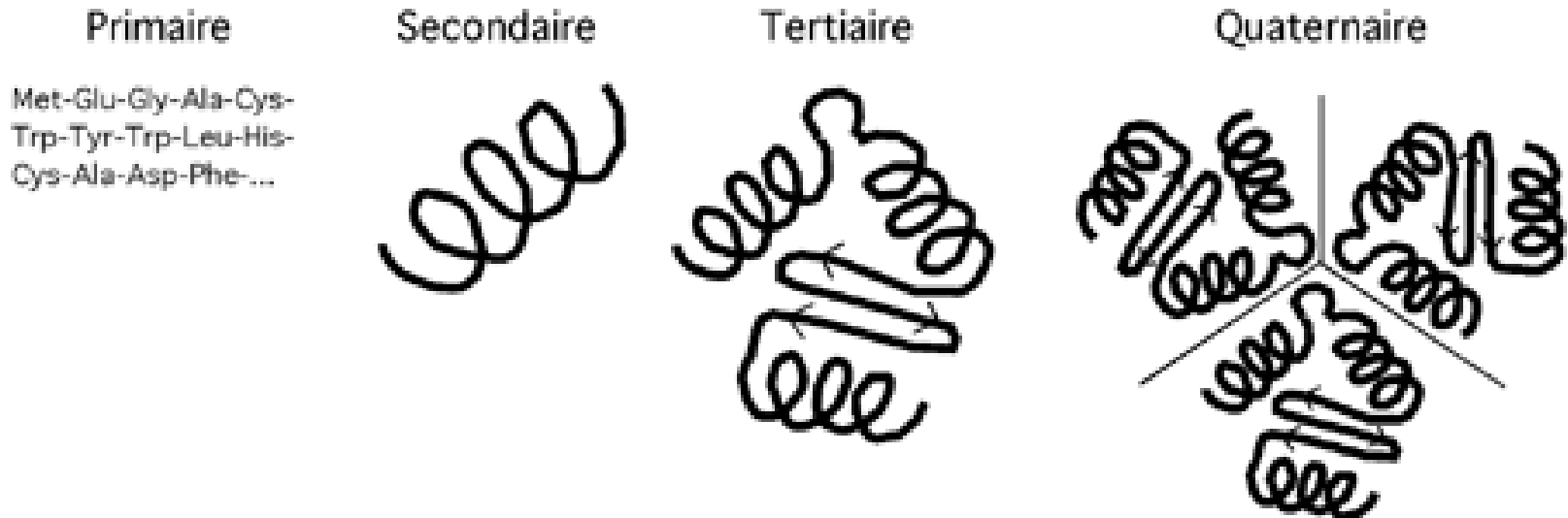
- Les protéines peuvent être classées selon leur forme globale.
 - Les protéines globulaires: myoglobine
 - Les protéines fibreuses : fonctions structurales ou protectrices (kératine, collagène ...)
- Les protéines peuvent être covalentement **liées à d'autres molécules**:
 - à un lipide; on parle de lipoprotéine,
 - à un glucide; on parle de glycoprotéine
 - si c'est à un métal; on parle de métalloprotéine

Structure tridimensionnelle des protéines

- Les protéines diffèrent les unes des autres parce qu'elles ont un nombre distinct et une séquence distincte de résidus d'acides aminés.
- Une séquence donnée d'acides aminés s'enroule en une structure tridimensionnelle unique et complexe désigné sous le terme de **conformation**;
- Cette conformation est réalisé grâce à l'établissement de liaisons *faibles*.

Structure tridimensionnelle des protéines

- Cette conformation est classée par ordre de complexité croissante en structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire.
- La structure tridimensionnelle des protéines renseigne sur le rôle qu'elles jouent dans la vie de la cellule (**relation structure-activité**).



Structure tridimensionnelle des protéines

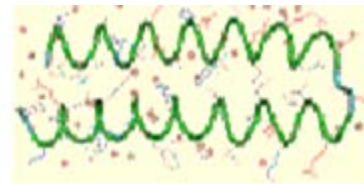
- La **structure primaire** est la structure chimique (covalente): quels acides aminés et dans quel ordre.
- La **structure secondaire** correspond aux structures spatiales régulières (hélices α , feuillets β etc...).
- La **structure tertiaire** concerne l'arrangement dans l'espace de ces structures secondaires, c'est à dire la position dans l'espace de chaque atome.
- La **structure quaternaire** est une association de structures tertiaires : certaines protéines existent sous forme de complexes comportant alors plusieurs sous-unités (exemple: l'hémoglobine).

Structure tridimensionnelle des protéines

structure primaire (I) ou séquence :
chaîne polypeptidique ou enchaînement
des acides aminés

310
FGDKTFV VQG FGNV
FXDKTFXX QGF GNV
LKGKRCL VSGAGNV

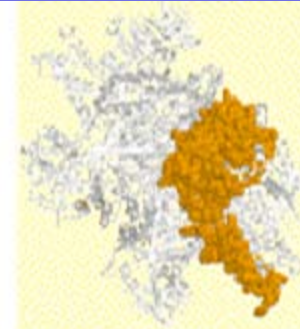
structure secondaire (II) :
hélices alpha - feuillets bêta
coudes, région non "structurées"



structure tertiaire (III) :
REPLIEMENT des protéines ("protein folding")
dans l'UNIQUE structure NATIVE
donc FONCTIONNELLE



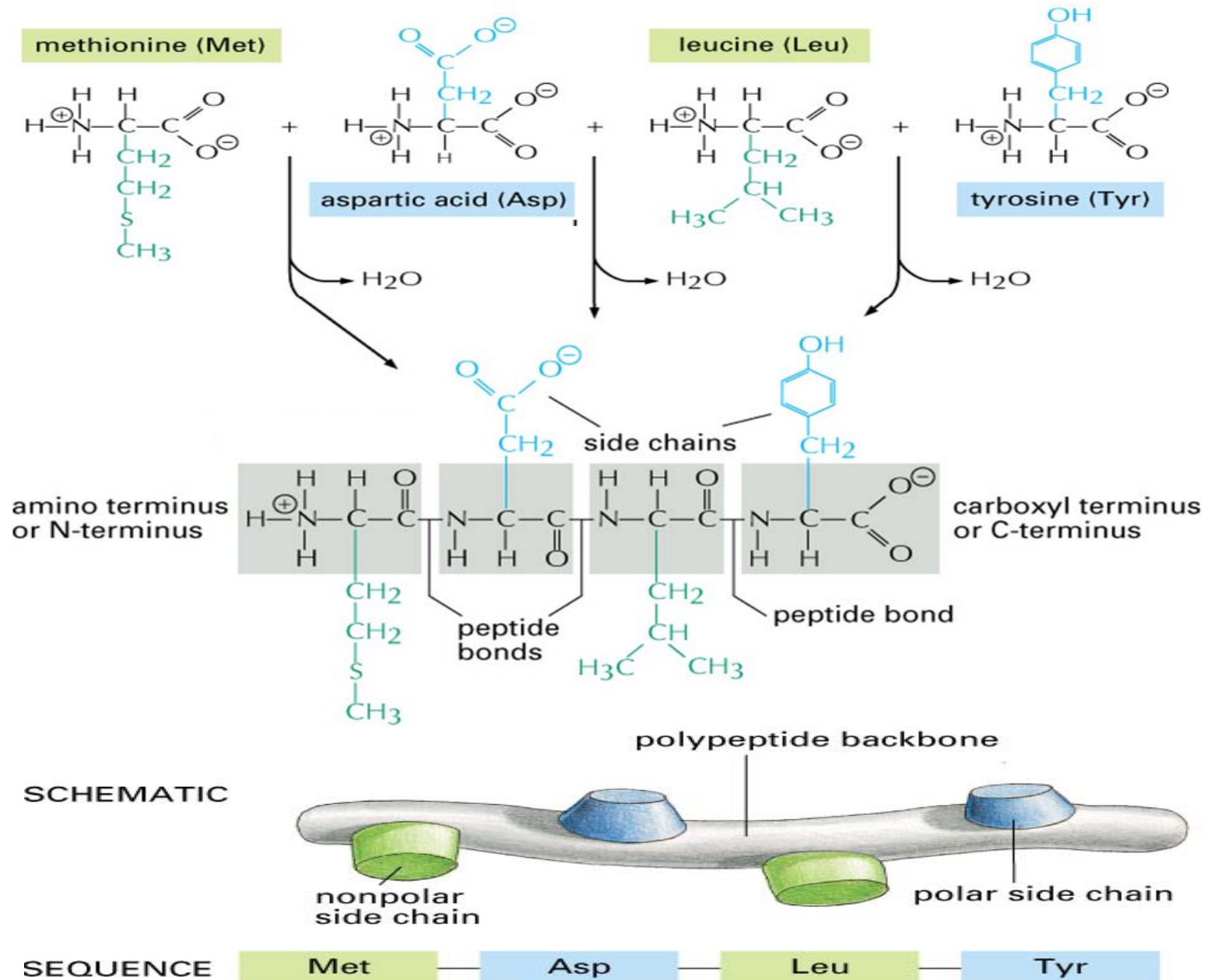
structure quaternaire (IV) :
assemblage de plusieurs sous-unités
(chaînes polypeptidiques repliées)
identiques ou non



Structure primaire

- Décrit la séquence ou l'ordre d'enchaînement des acides aminés qui constituent la protéine.
- Cette séquence est fixée et traduit l'information contenue dans le gène qui code cette protéine.
- Les AA sont numérotés en allant du N-terminal vers le C-terminal.
- La structure primaire s'écrit en utilisant le code à 1 lettre ou le code à 3 lettres.
- | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|-------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| M | V | H | L | T | P | E | E | K | S | A | V | T | A | L ... |
- Met Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Ser Ala Val Thr Ala Leu ...
N-term C-term

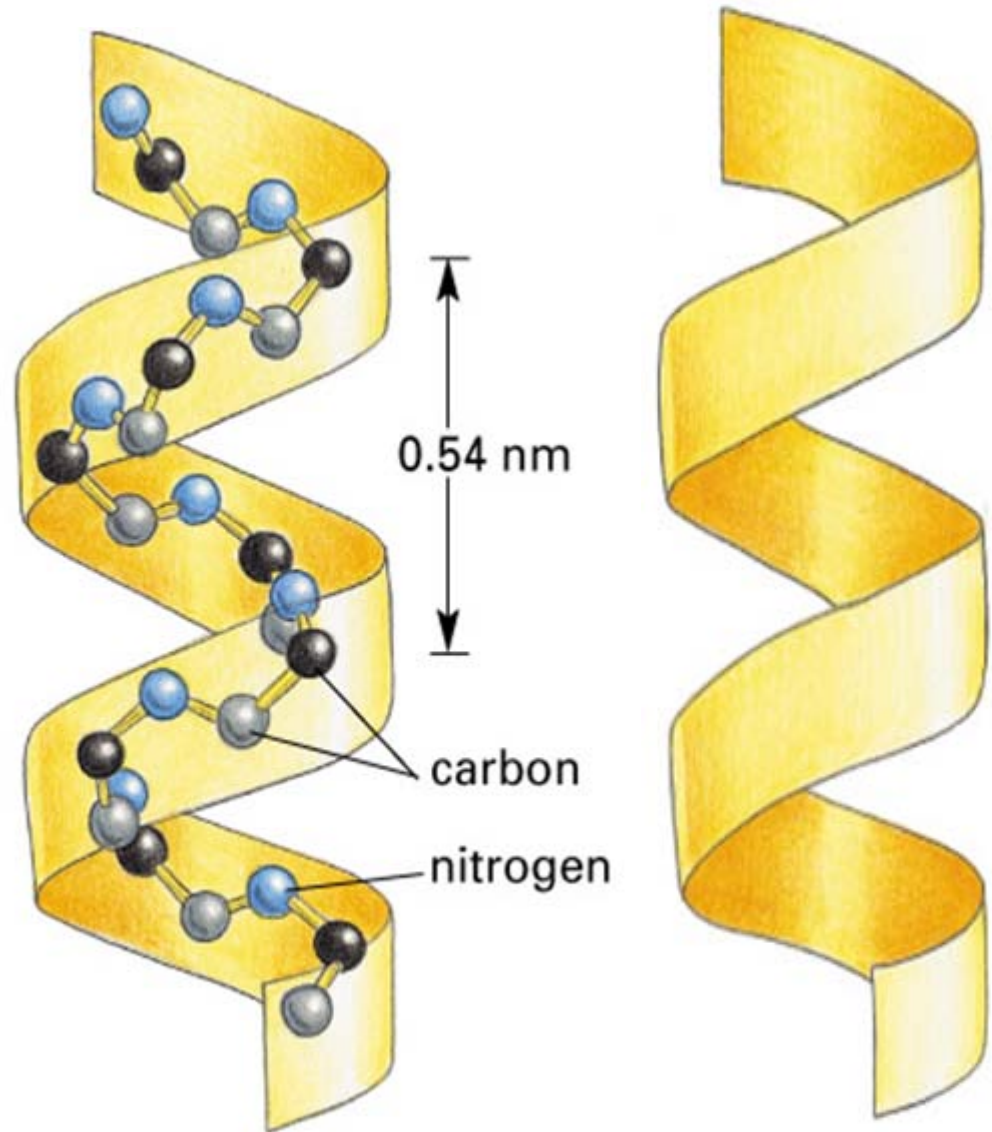
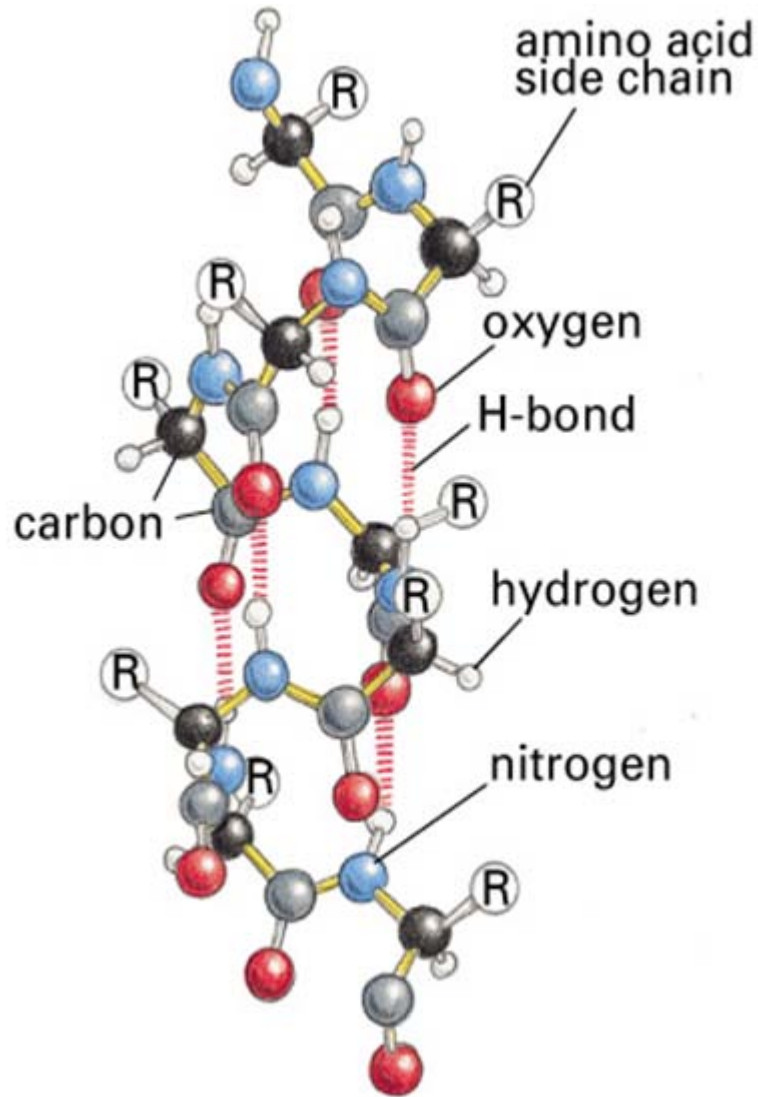
Structure primaire



Structure secondaire :

- 1^{er} stade de l'organisation dans l'espace d'une chaîne peptidique.
- Une chaîne d'AA possède au niveau des liaisons peptidique de nombreux groupements --CO-- et --NH-- ceux-ci peuvent établir en eux dans l'espace des liaisons hydrogène et former une structure secondaire.
- Les structures secondaires (stables) les plus fréquentes sont l'hélice α , le feuillet plissé β et les coudes β .

L'hélice α

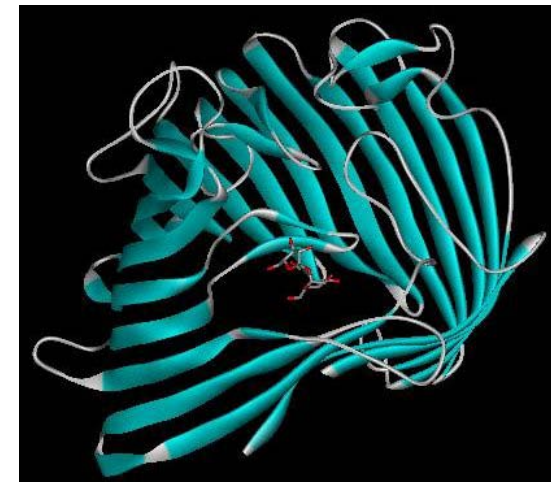
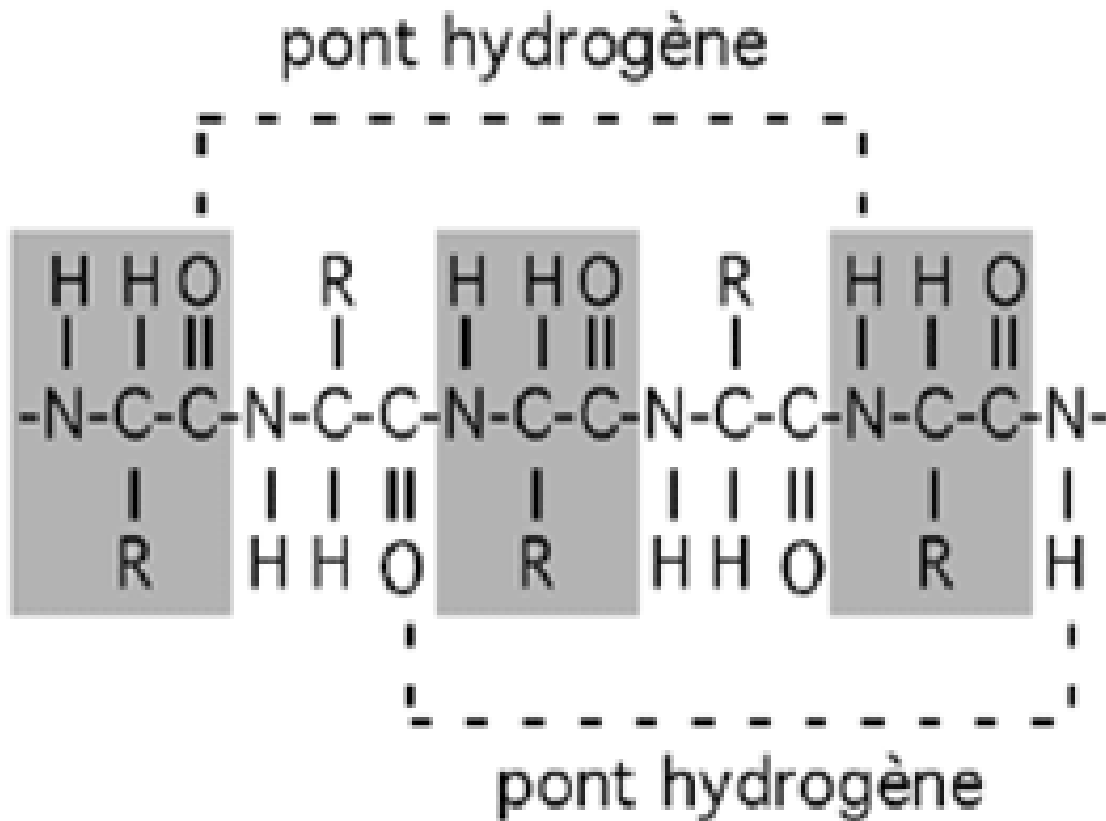


L'hélice α

- La chaîne principale s'enroule en spirale, vers la droite.
- Structure stabilisée par des liaisons hydrogènes (intramoléculaires) entre les résidus n et $n+4$.
- L'hélice α s'élève de 0,54nm à chaque tour.
- Elle compte 3,6 résidus par tour. .
- Les plans des liaisons peptidiques sont parallèles à l'axe de l'hélice.
- Les chaînes latérales R et liaisons C-H pointent vers l'extérieur.

L'hélice α

(Hélice étalée)



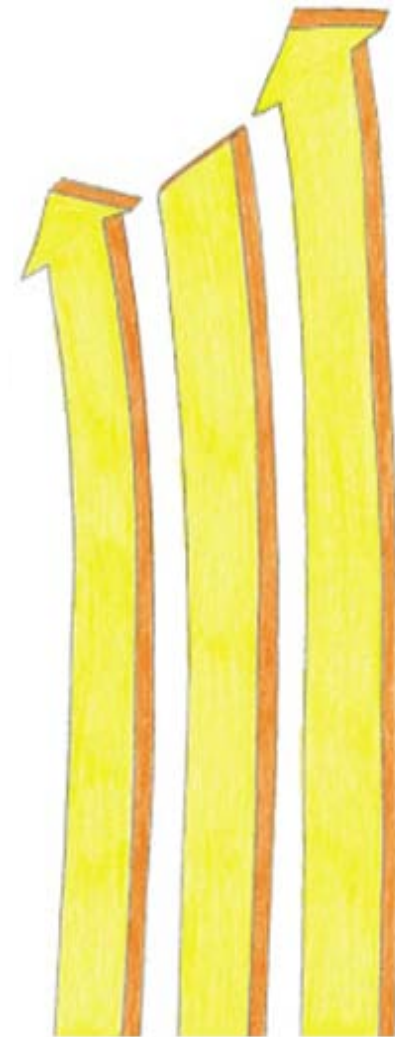
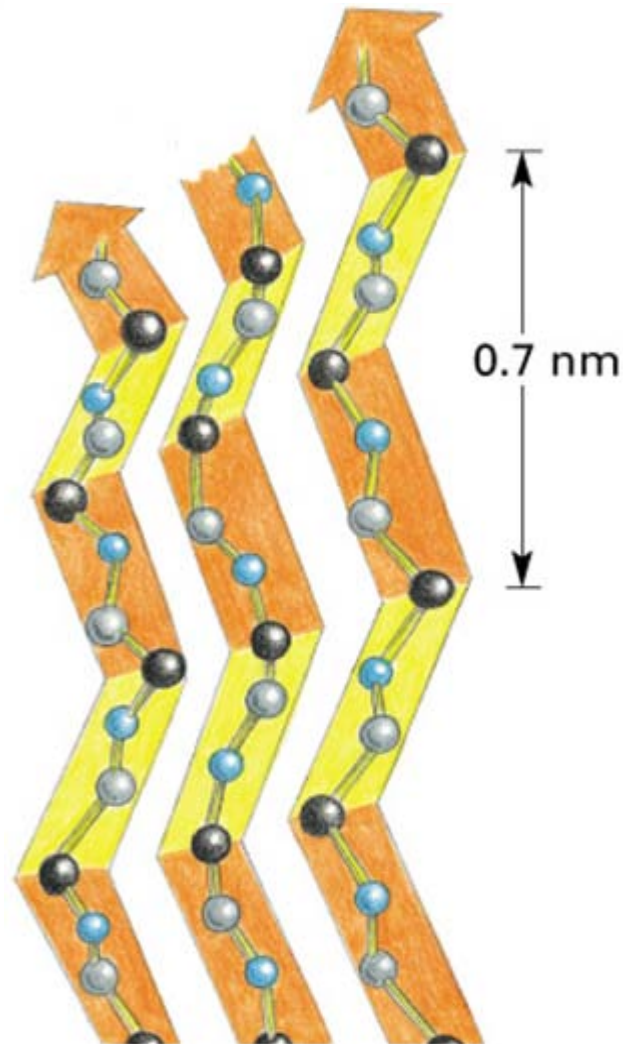
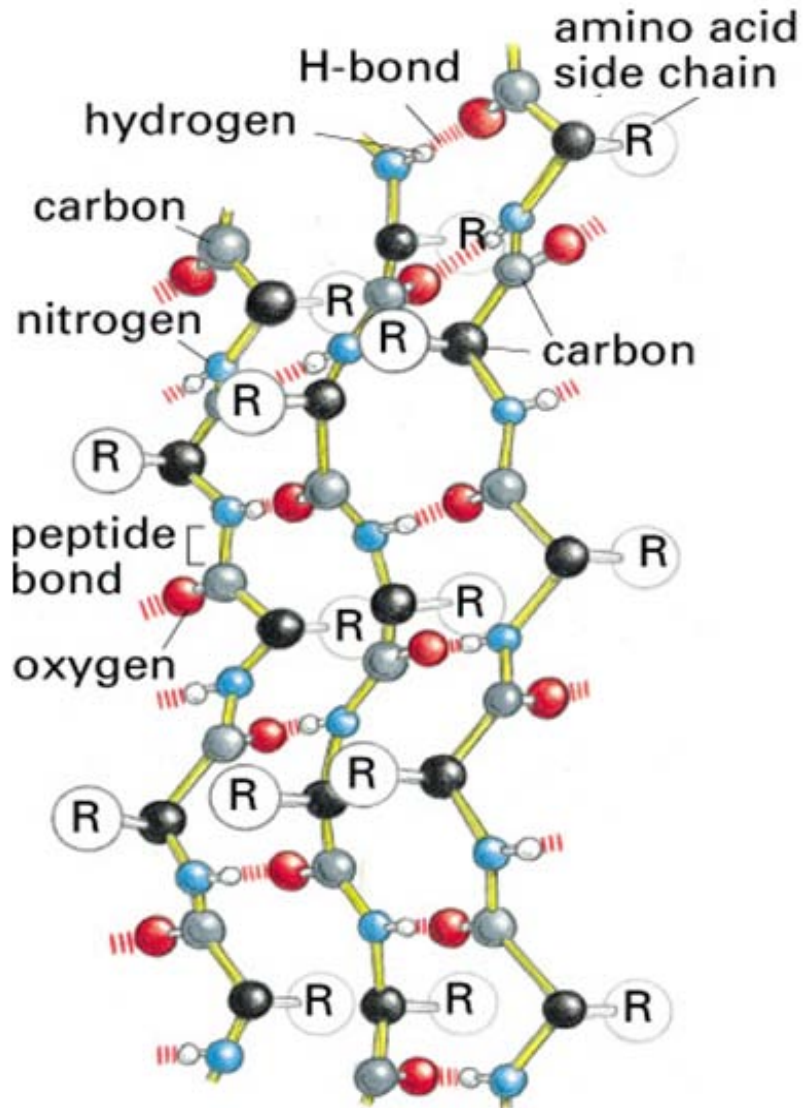
L'hélice α

La **kératine** de nos cheveux est une protéine en hélice α qui forme une fibre allongée.



Hélice α

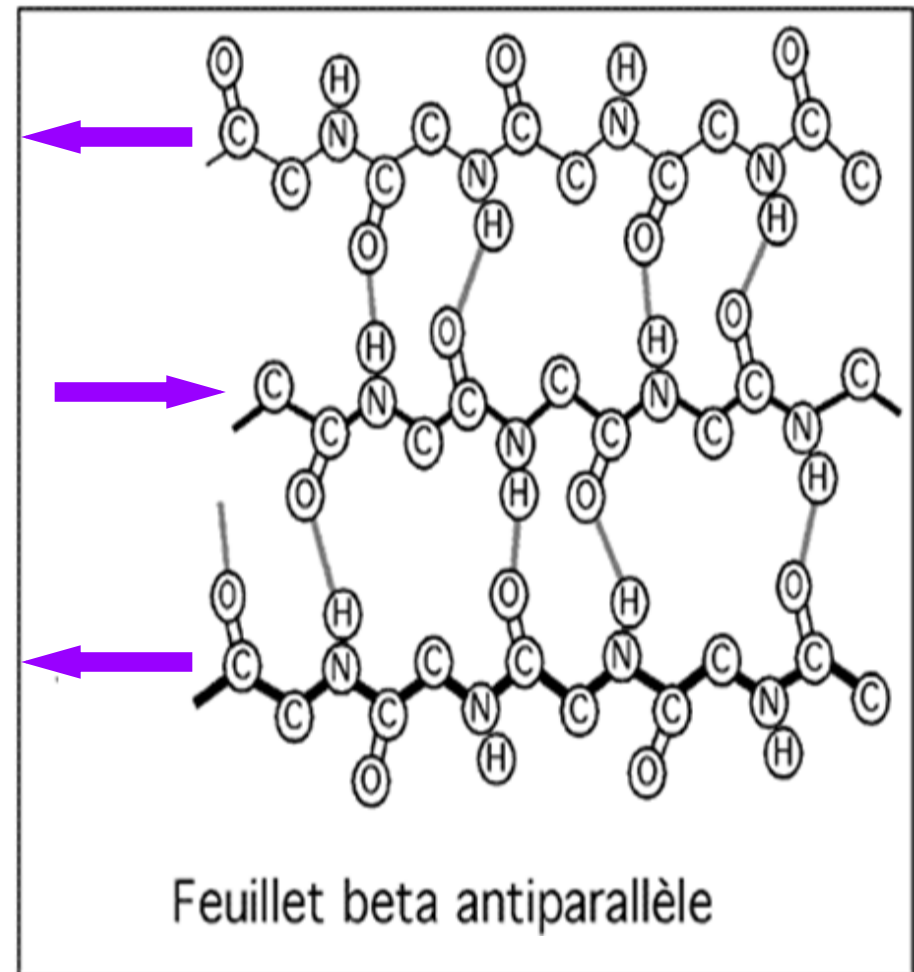
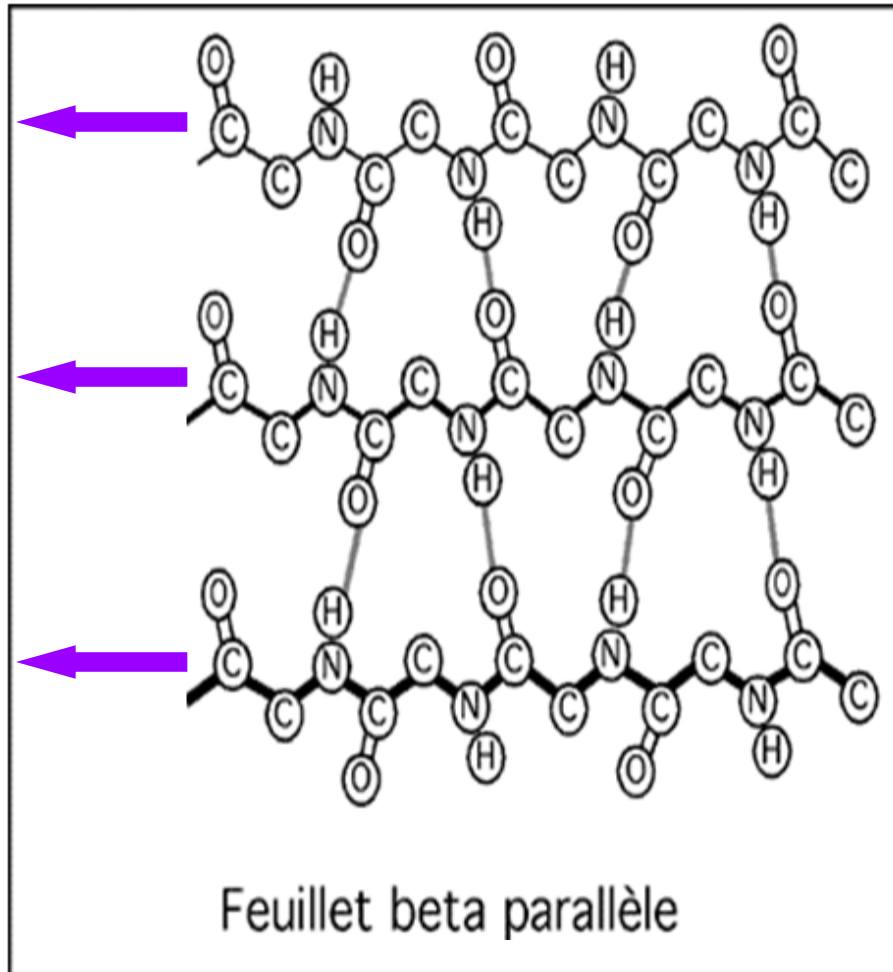
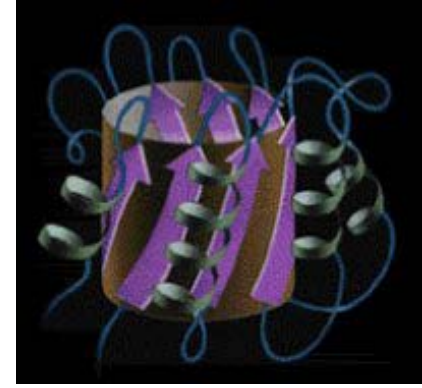
Feuillet plissé β



Feuillet plissé β

- La chaîne peptidique se trouve sous **forme en zigzag**.
- La chaîne principale est étirée et deux segments de la protéine se placent côte à côte, unis par **des liaisons hydrogènes** entre les groupements C=O et NH.
- Si les segments sont orientés dans le **même sens**, on parle de **feuillet parallèle**.
- Si les segments sont orientés dans le **sens contraire**, on parle de **feuillet antiparallèle**.
- Les chaînes latérales, R, se dressent au sommet des arêtes.

Feuillet plissé β



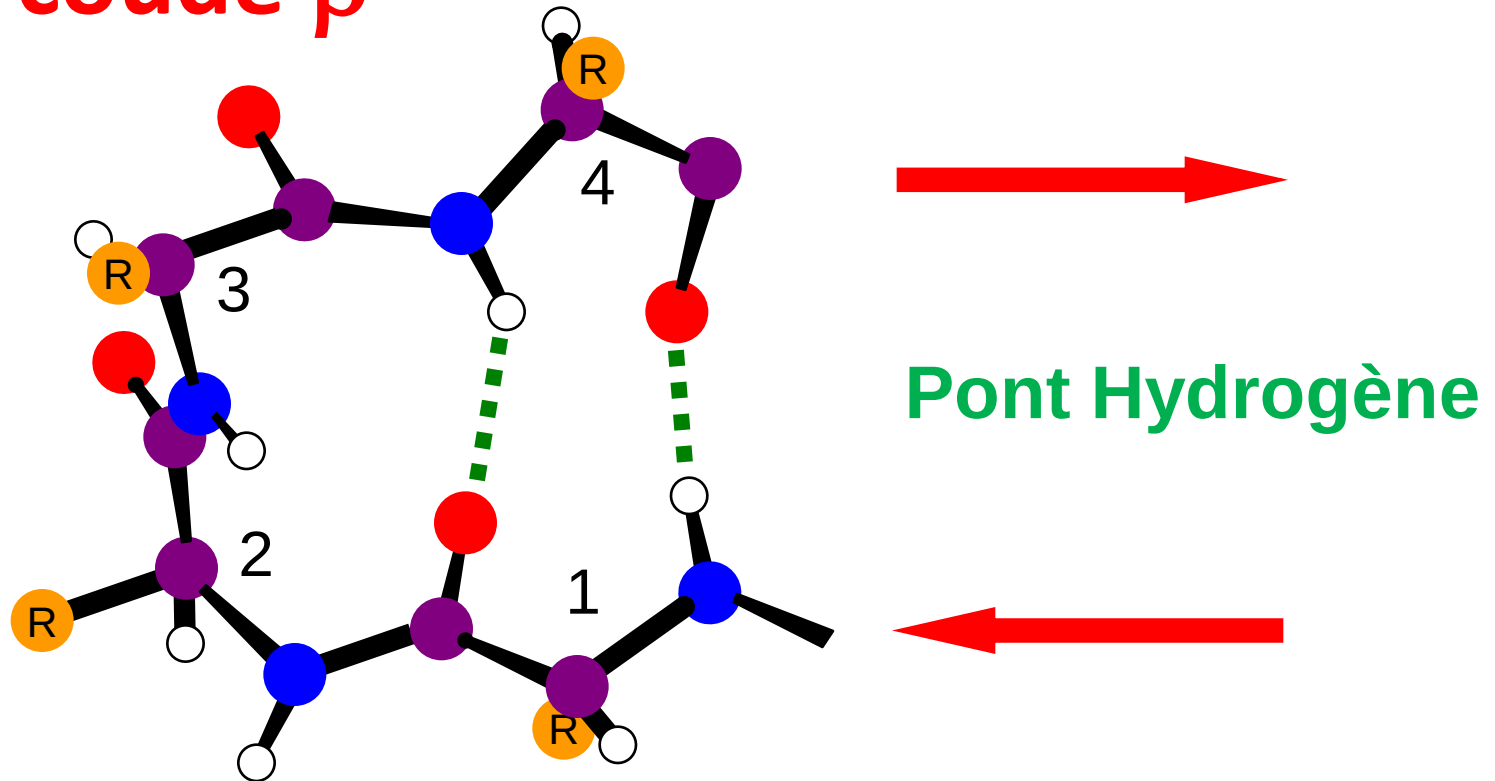
Feuillet plissé β

La **fibroïne** est une protéine sécrétée par le ver à soie qui donnera le fil de soie. Cette protéine est constituée essentiellement de **feuilletés plissés β** .



feuilletés plissés β

Le coude β



- Le coude ou tour β est un coude serré impliquant **4 résidus** et qui permet à la chaîne de changer de direction.
- La chaîne principale de la protéine fait un tour en U; retrouvé souvent à la **jonction** de deux segments de la chaîne formant un feuillet β antiparallèle.
- Ces coudes contiennent en général **une glycine ou une proline**.

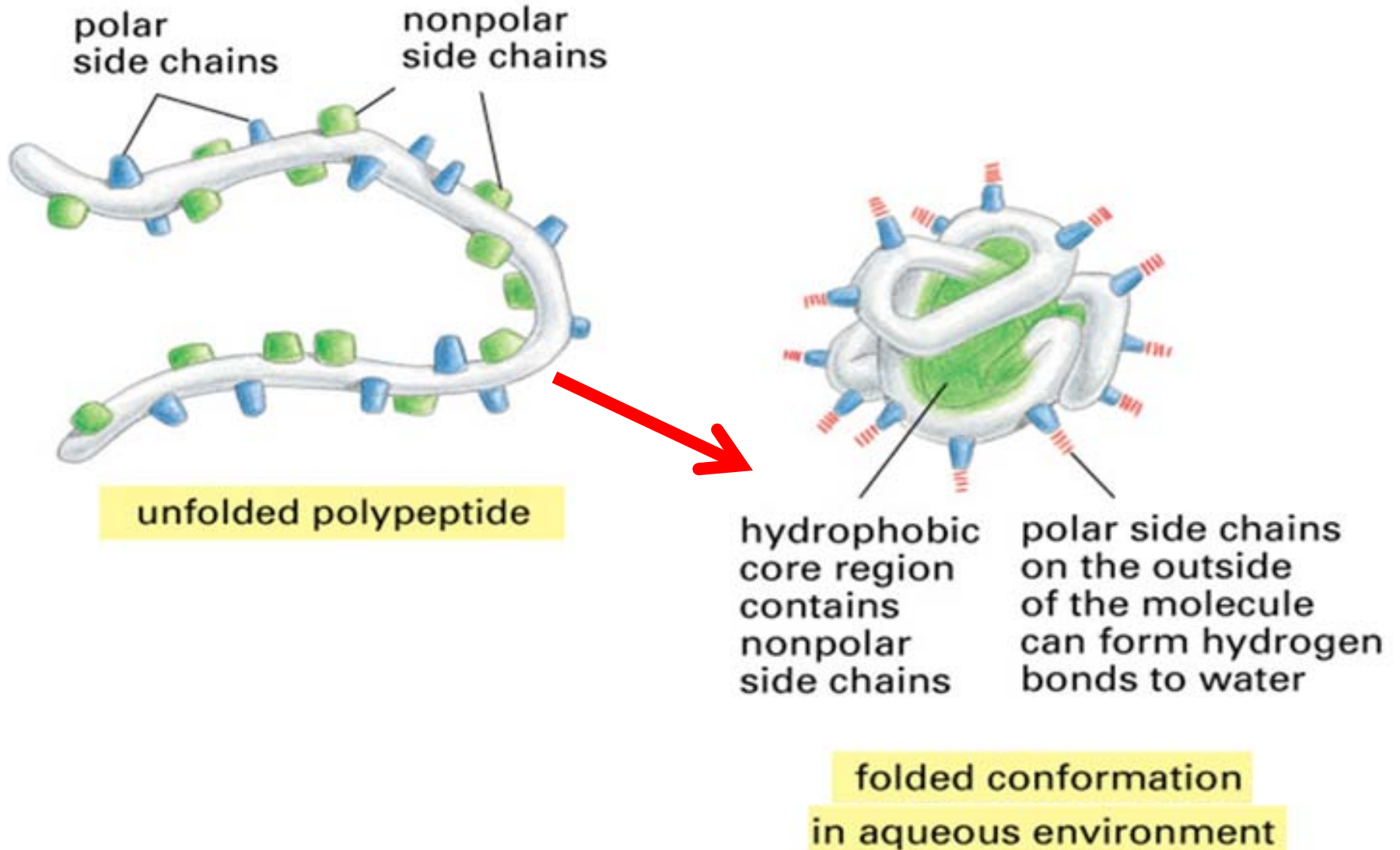
Structure tertiaire

- La structure tertiaire consiste en une **organisation des structures secondaires entre elles**.
- Cela implique l'apparition de **liaisons** hydrogène, ioniques, de forces hydrophobes et parfois de ponts disulfure.
- La structure tertiaire **correspond à la structure tridimensionnelle** de la protéine.
- **Une structure tertiaire n'est pas une structure figée** : elle peut se modifier (se tordre, se déformer) sous l'effet de la fixation d'une molécule (ligand) ou sous l'effet de la variation d'un paramètre physico-chimique (pH, température).

Structure tertiaire

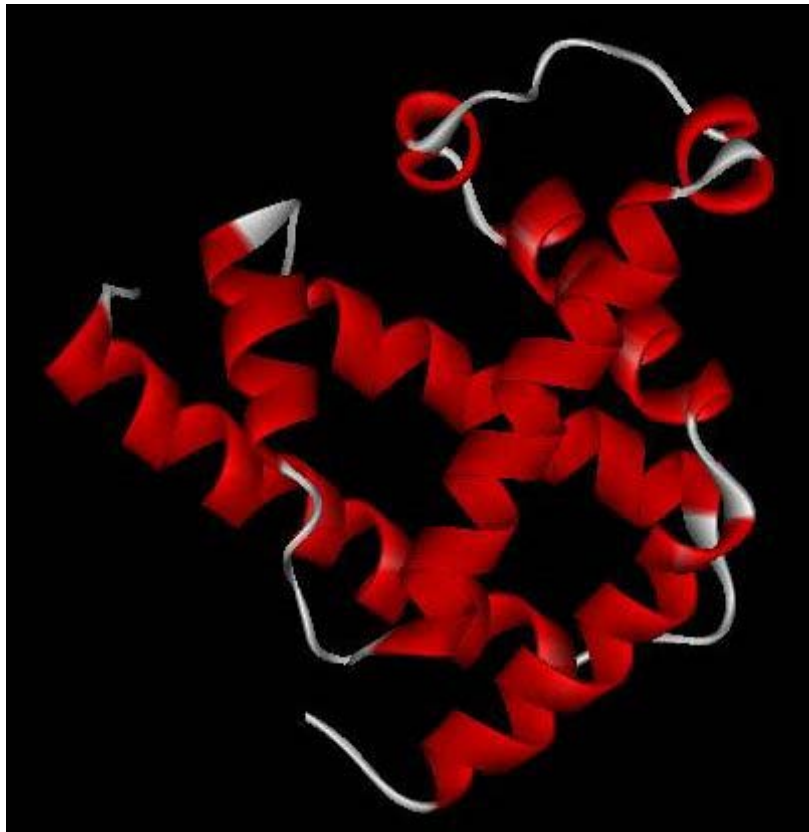
- Une protéine **soluble** (qui sera au contact de l'eau) va se replier de façon à ce que les résidus les plus polaires soient au contact du solvant.
- Les résidus apolaires, eux, seront au cœur de la protéine de façon à ne pas interagir avec l'eau.
- Une protéine **hydrophobe** (qui sera insérée dans des lipides) va se replier de façon à ce que les résidus les plus hydrophobes soient au contact des lipides qui l'entourent.
- Les résidus polaires, eux, seront au cœur de la protéine de façon à ne pas interagir avec ces lipides.

Liaisons hydrophobes

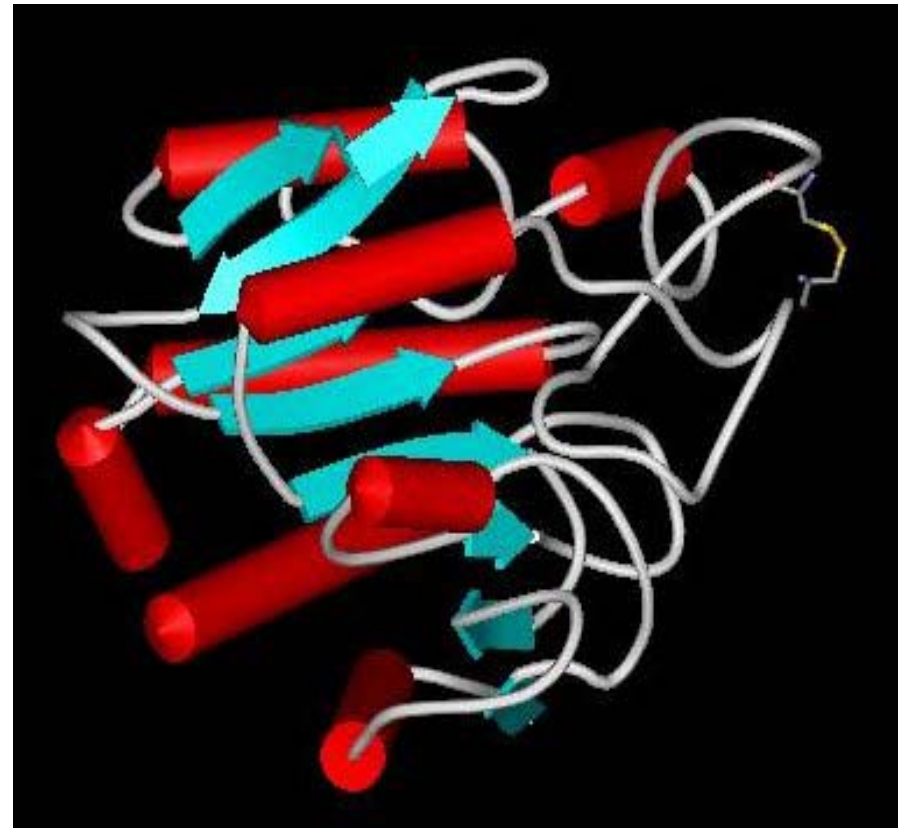


Exemple de structure tertiaire

Myoglobine



Carboxypeptidase

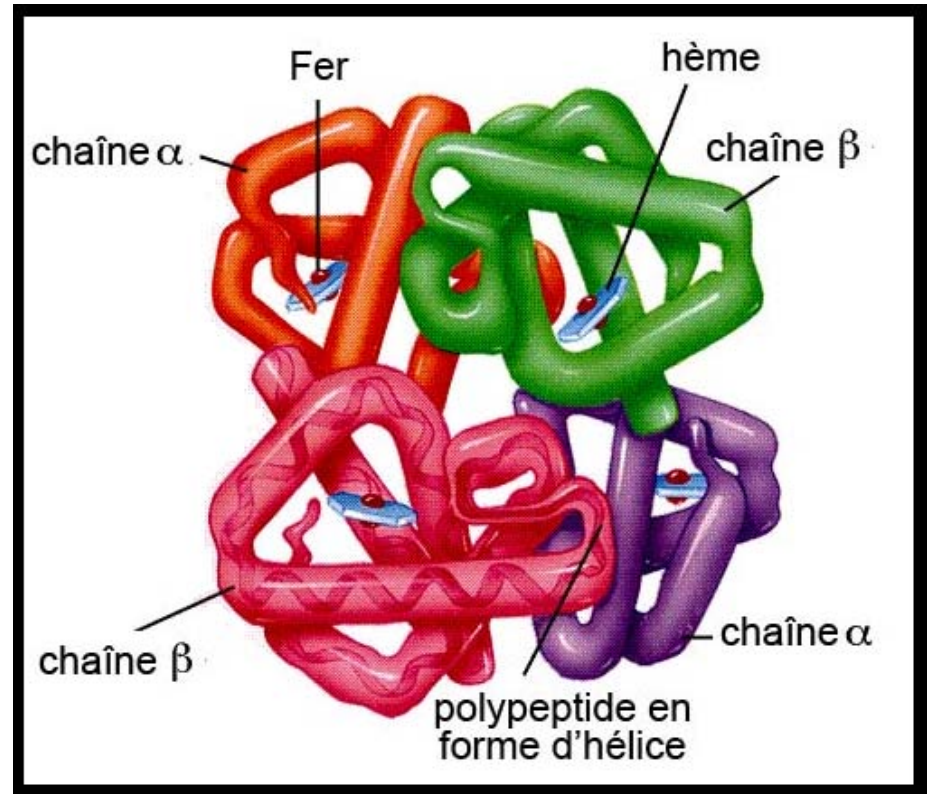


Structure quaternaire:

- C'est l'association de plusieurs chaînes peptidiques pour donner un complexe stable et actif.
- Plusieurs sous-unités tridimensionnelles (structures tertiaires) s'assemblent pour former des unités fonctionnelles beaucoup plus grandes (enzymes, ribosomes et des fibres protéiques).
- Les chaînes qui constituent ce complexe sont des protomères ou sous-unités, chacune ayant une structure tertiaire définie.
- L'association des différentes chaînes se fait via des liaisons faibles et parfois aussi via des ponts disulfures.

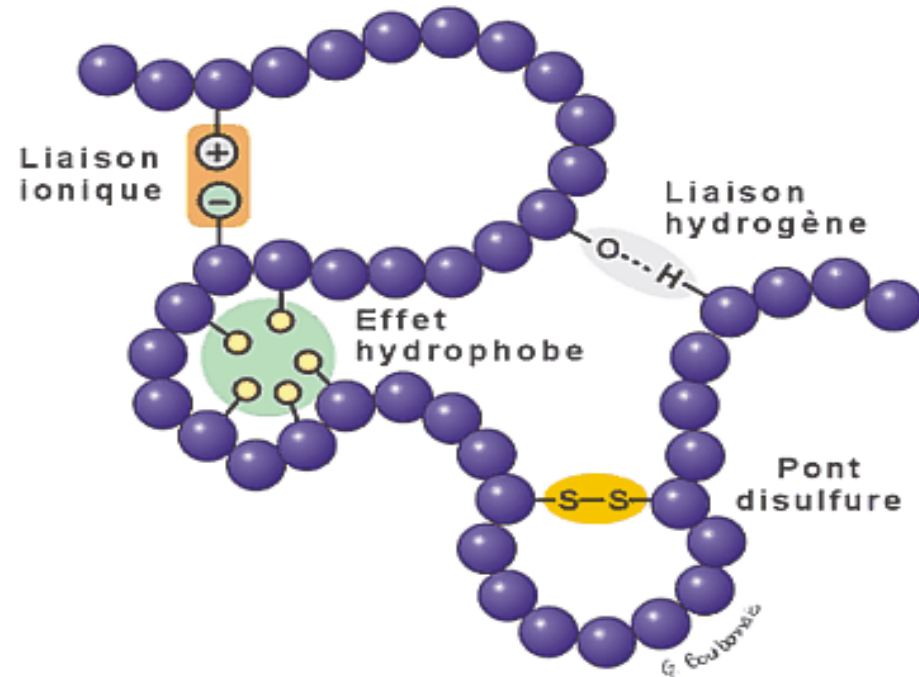
Structure quaternaire:

- Exemple: L'hémoglobine
- Un transporteur d'oxygène,
- Possède une structure quaternaire,
- Formée de quatre sous-unités (2 et 2).



Les différents types de liaisons ou forces impliquées dans la structuration des protéines

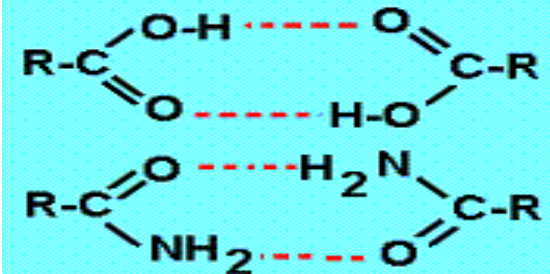
- Structure primaire: liaisons peptidiques (covalentes), les ponts disulfure
- Structures II, III et IV^{aires} : liaisons faibles éventuellement covalentes
 - Les liaisons hydrogène,
 - Les liaisons ioniques,
 - Les forces hydrophobes
 - Les ponts disulfure



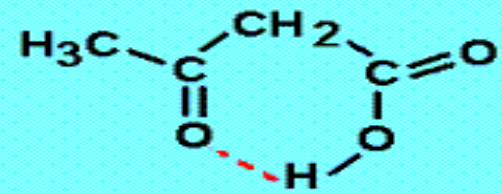
Les liaisons hydrogène

- Une liaison hydrogène se forme lorsqu'un atome d'hydrogène déjà lié par covalence à un autre atome électronégatif subit l'attraction d'un autre atome électronégatif.
- Dans les cellules, les atomes électronégatifs qui participent à des liaisons hydrogène sont le plus souvent l'oxygène et l'azote.
- Les liaisons hydrogène sont environ vingt fois plus faibles que les liaisons covalentes.
- Les liaisons faibles permettent de brefs contacts entre les molécules; les molécules s'associent, réagissent l'une à l'autre, puis se séparent.

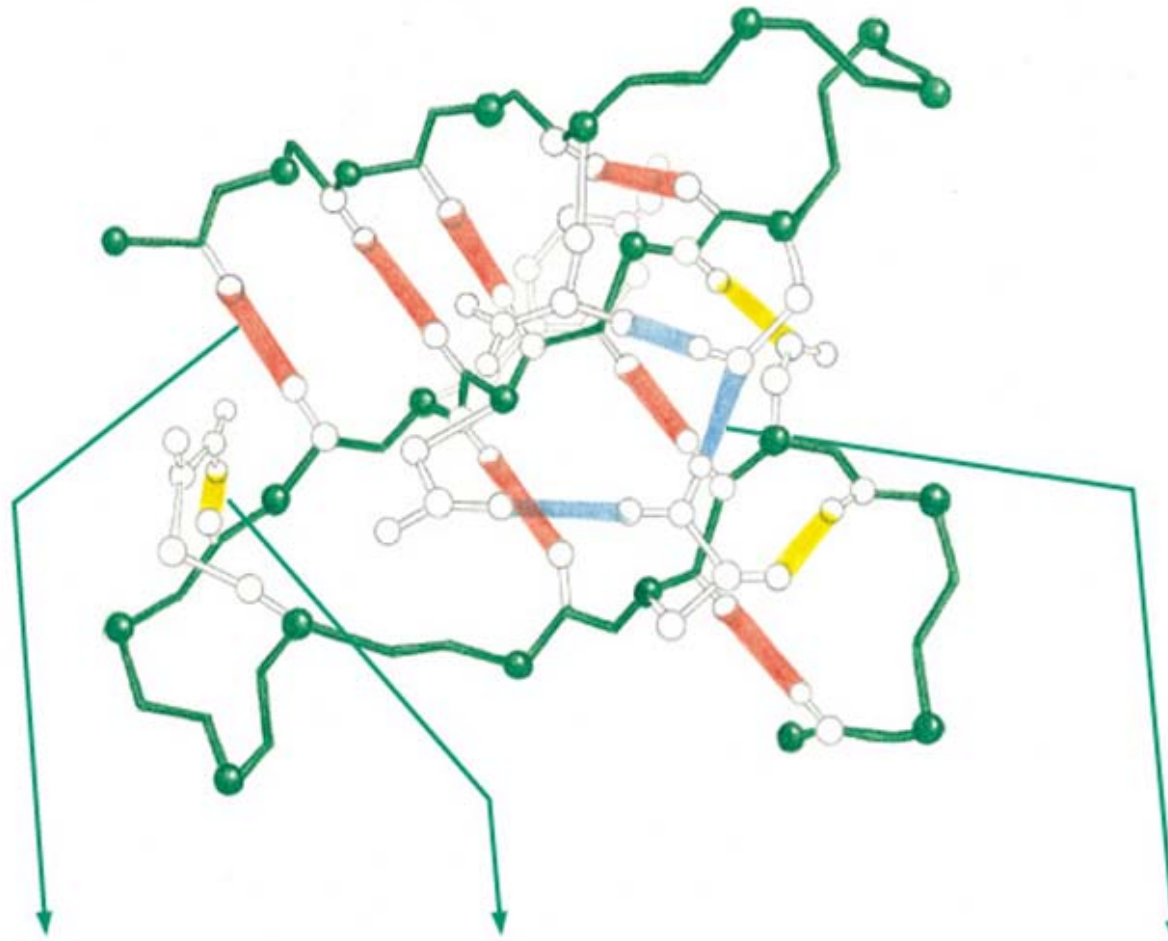
LIAISONS HYDROGENE INTERMOLECULAIRES



LIAISON HYDROGENE INTRAMOLECULAIRE (Beta CETOACIDE)



Les liaisons hydrogène



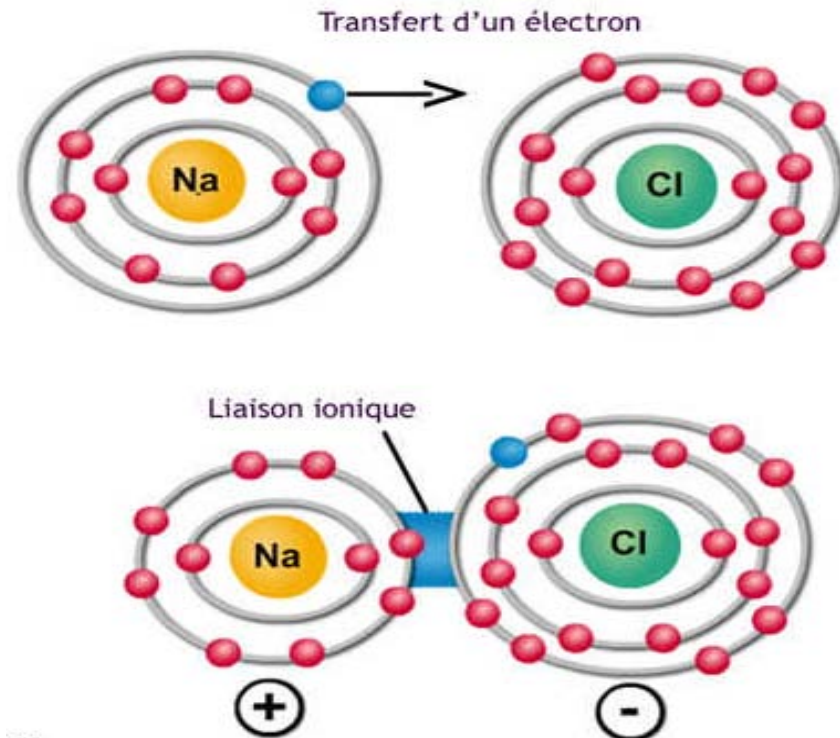
hydrogen bond between
atoms of two peptide
bonds

hydrogen bond between
atoms of a peptide
bond and an amino
acid side chain

hydrogen bond between
two amino acid side
chains

Liaison ionique

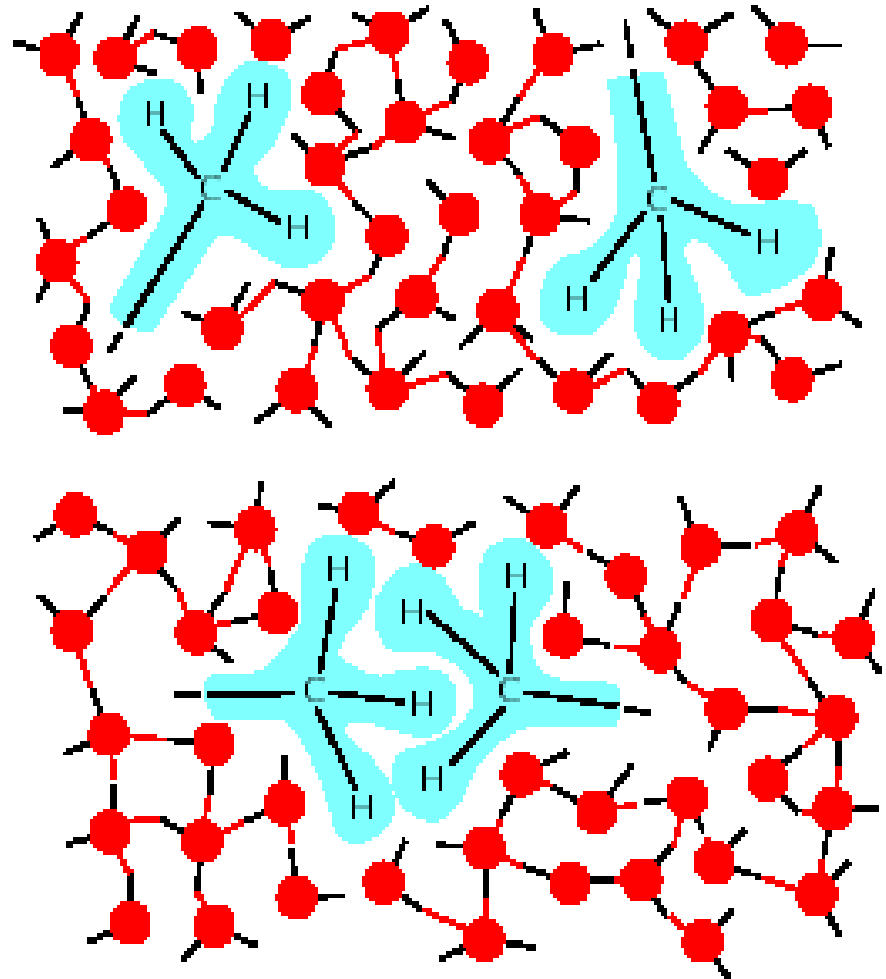
- Un atome cède un ou plusieurs électrons pour former un ion chargé positivement (cation). Un autre atome capte ces électrons pour former un ion chargé négativement (anion).
- Il y a donc transfert d'électrons entre les atomes. (oxydation : l'atome perd des électrons et réduction : l'atome gagne des électrons).
- Les cations et les anions s'attirent l'un l'autre dans une liaison ionique (En raison de leurs charges opposées).
- Par exemple, le chlorure de sodium (NaCl) ou sel de cuisine.



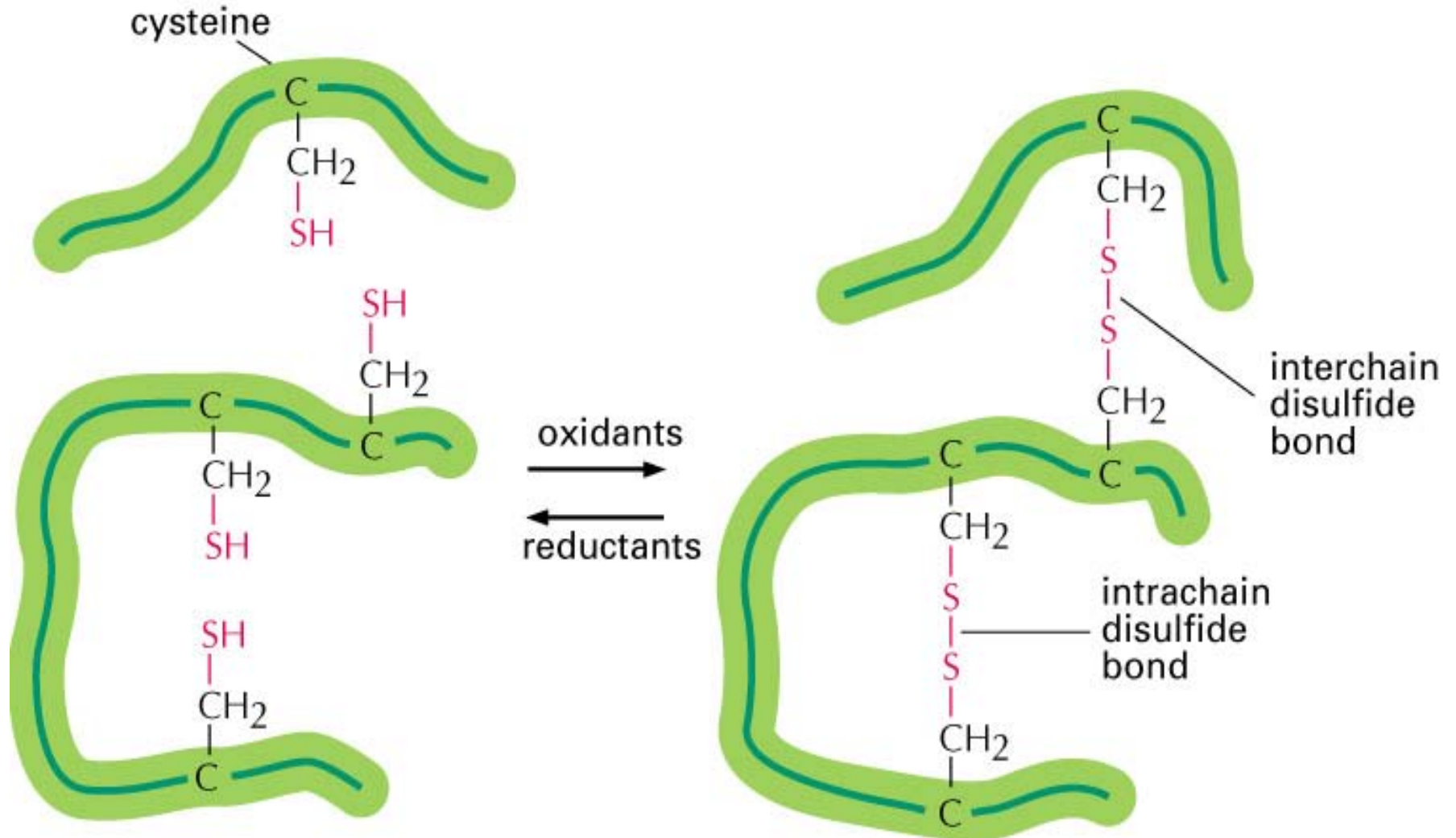
Forces hydrophobes

- Comme les molécules non polaires ne peuvent pas réagir avec l'eau.
- Elles tendent à créer entre elles des liaisons de type interactions hydrophobes

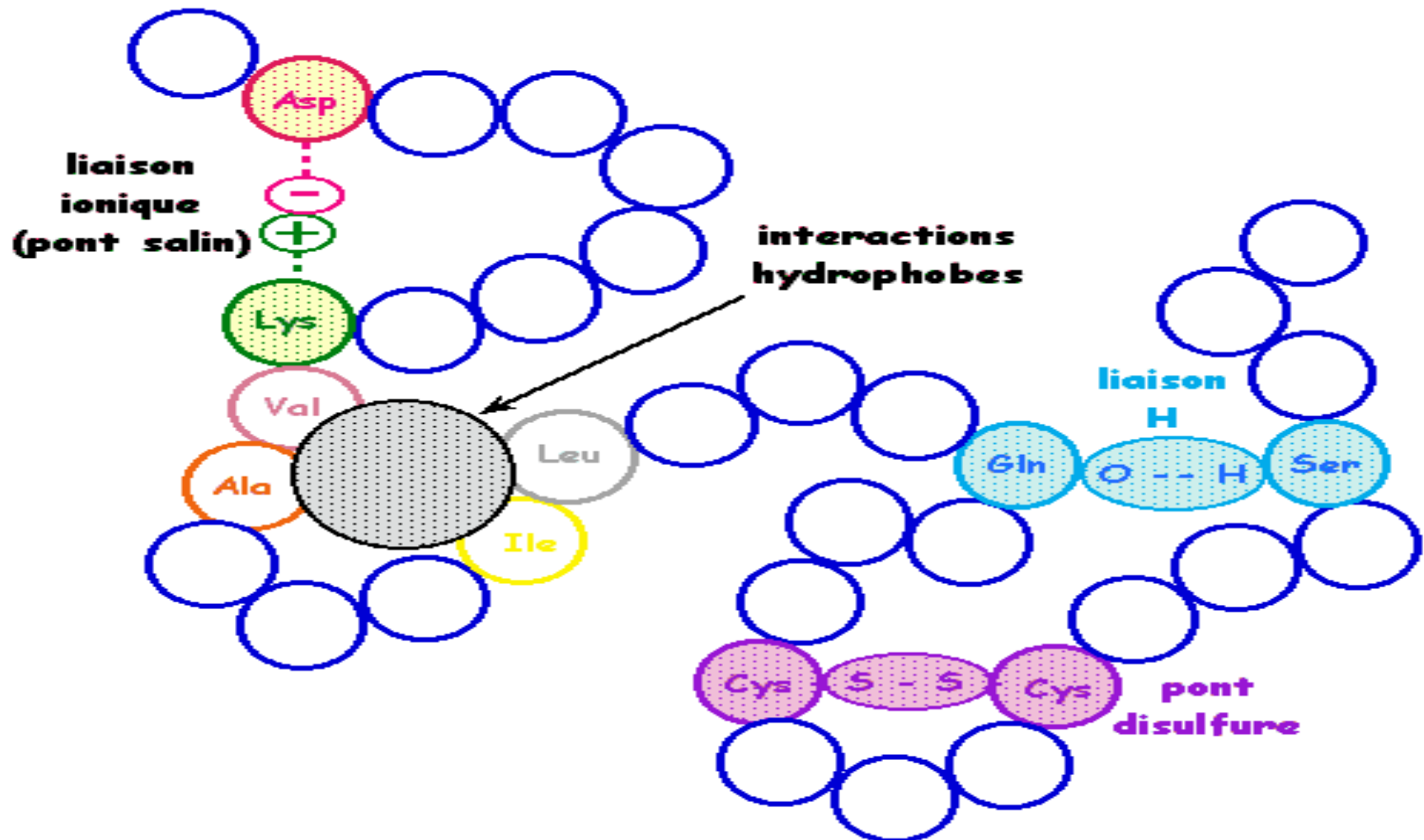
HYDROPHOBIC FORCES



Les ponts disulfures



Les différents types de liaisons ou forces impliquées dans la structuration des protéines



Plan

- Quelques différences entre les différentes formes des protéines.
- Exemples de protéines fibreuses
 - Collagène
 - Kératine
- Techniques d'étude des structures des protéines
- Propriétés physico-chimiques des protéines
 - Masses molaires
 - Caractère amphotère
 - Solubilité
 - En fonction de la force ionique
 - En fonction du pH
 - Stabilité thermique des protéines
 - Autres propriétés

Quelques différences entre les différentes formes des protéines

Protéines fibreuses	Protéines globulaires
Forme allongée et mince	Forme sphérique et compacte
Insolubles dans la cellules	Solubles dans le cytoplasme ou dans la phase lipidique des membranes cellulaires
Fonction mécanique et structurale	Agents principaux de l'activité biologique de la cellule
- α-keratines - fibroïne - collagène - élastine	- enzymes (catalyseur cellulaires) - transporteurs d'oxygène ou de lipides (sang) - hormones - récepteurs intégrés à la membrane et médiateurs d'effets hormonaux - immunoglobulines (anticorps) - etc

EXEMPLES DE PROTÉINES FIBREUSES

Collagène

1: Chaîne α



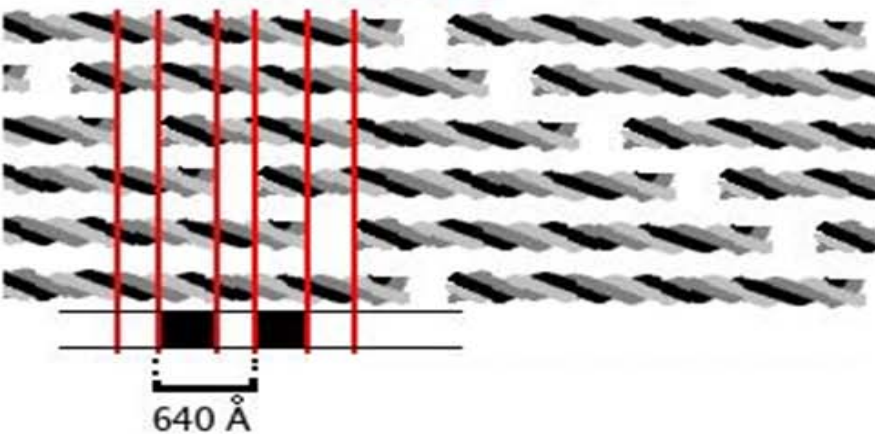
2: Procollagène



3: Tropocollagène



4: Fibrille

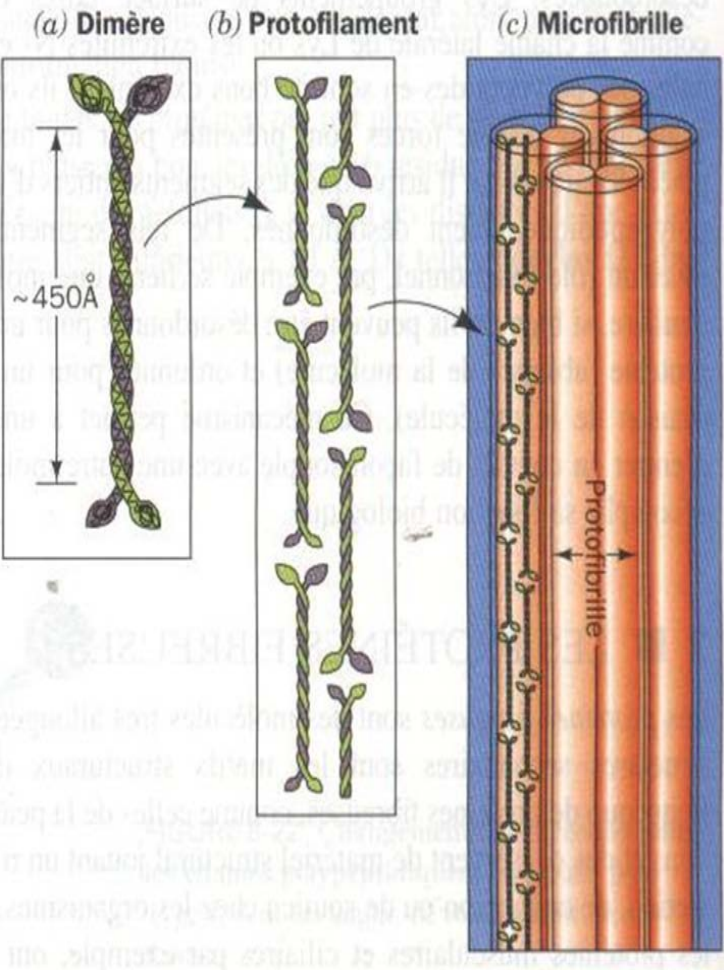


5: Fibre



- Protéine extracellulaire insolubles très résistantes.
- 3 types: I (90%), II, III.
- Retrouvé partout dans l'organisme dans l'os, le cartilage, les tendons, les ligaments, les vaisseaux, etc.
- Structure en triple hélice α
- 1/3 des résidus d'AA= glycine (Gly-X-Y).
- Présence d'hydroxyproline et d'hydroxylysine.
- Contient des sucres (glucose, galactose).

La kératine



- Protéine insoluble dans l'eau; retrouvée dans la peau.
- **Cheveux** : constituée de 14 % de cystéine (ponts disulfures) = rigidité.
- 2 types:
- **La kératine α** : formée d'hélice α = mammifères (cheveux et ongles).
- **La kératine β** : formée de feuillet β plissés antiparallèles = oiseaux (plumes)
- Lors de la coiffure (permanente), il y a cassure des ponts disulfure et réassemblage.

Techniques d'étude des structures des protéines

- Les méthodes les plus importantes pour la détermination des 4 types de structures des protéines sont:

Structure	Méthode
<i>Primaire</i>	<i>Séquençage</i>
<i>Secondaire</i>	<i>Dichroïsme circulaire, RMN, Diffraction</i>
<i>Tertiaire</i>	<i>RMN, Diffraction des Rayons X</i>
<i>Quaternaire</i>	<i>Résonnance Magnétique Nucléaire, Diffraction</i>

PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PROTÉINES

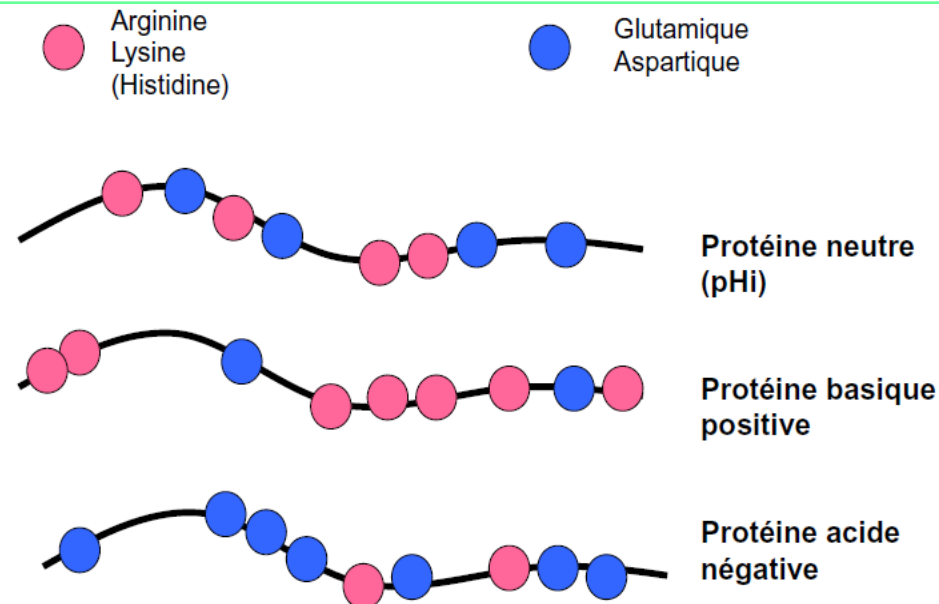
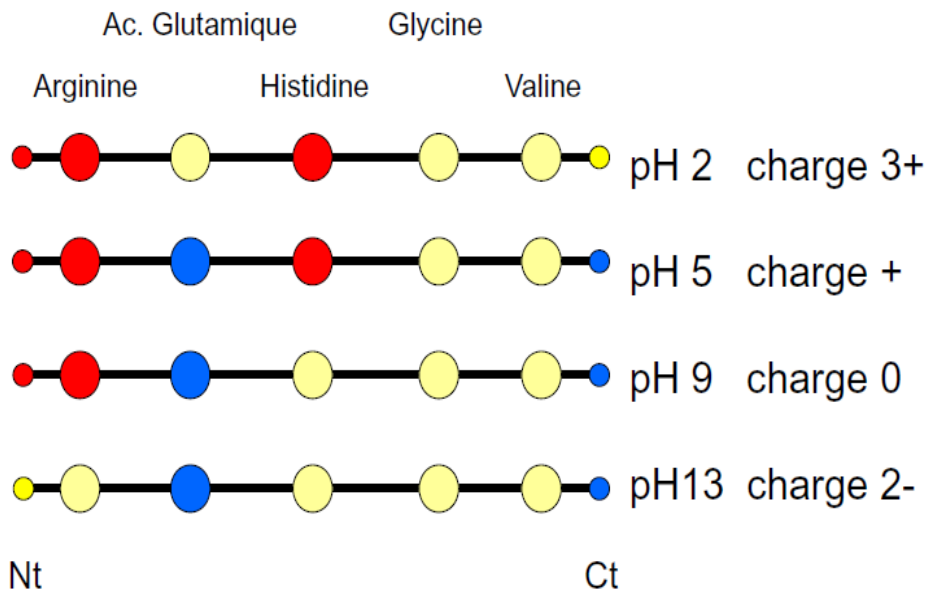
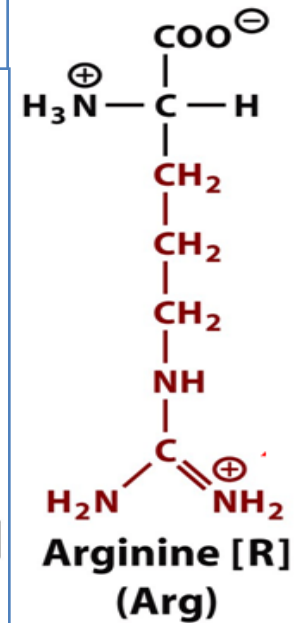
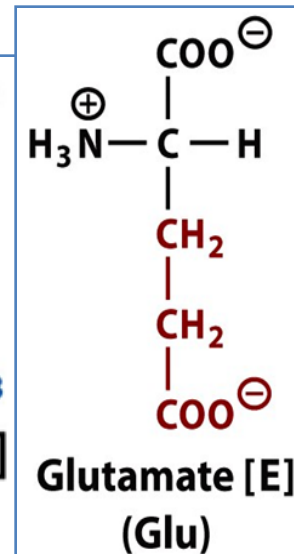
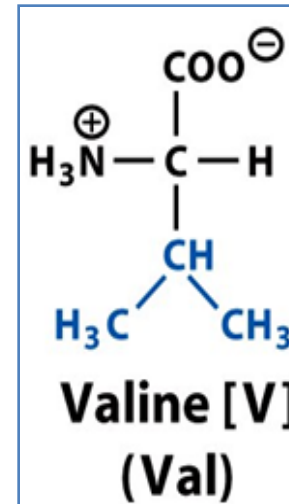
Masses molaires

- La masse moléculaire s'échelonne de 10KDa à plusieurs millions.
- La masse moléculaire d'une protéine est souvent utilisée comme élément caractéristique servant à la définition ou à la nommer:
 - ex : P47 c'est une protéine de 47KDa

Protéine	Masse moléculaire (dalton)
Cytochrome c	12300
Myoglobine	17200
Anhydrase carbonique	30000
Ovalbumine	42700
Albumine	66250
Ovotransferrine	76-78000

Caractère amphotère des protéines

- Caractère amphotère (comme AA), avec un degré de complexité plus élevé en raison du plus grand nombre de charge mis en jeu.

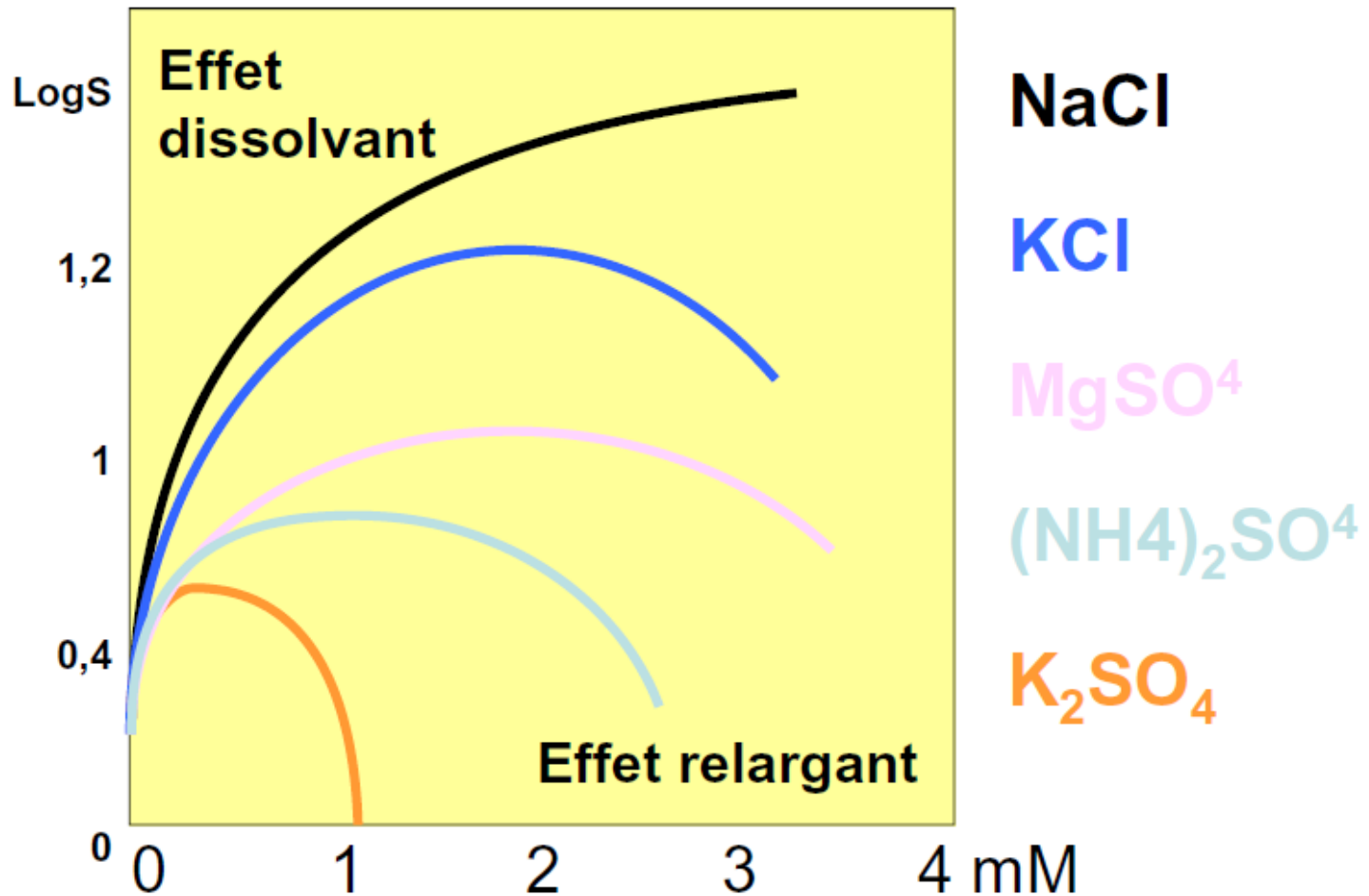


Histidine: pouvoir tampon à pH neutre avec pHi =

La solubilité

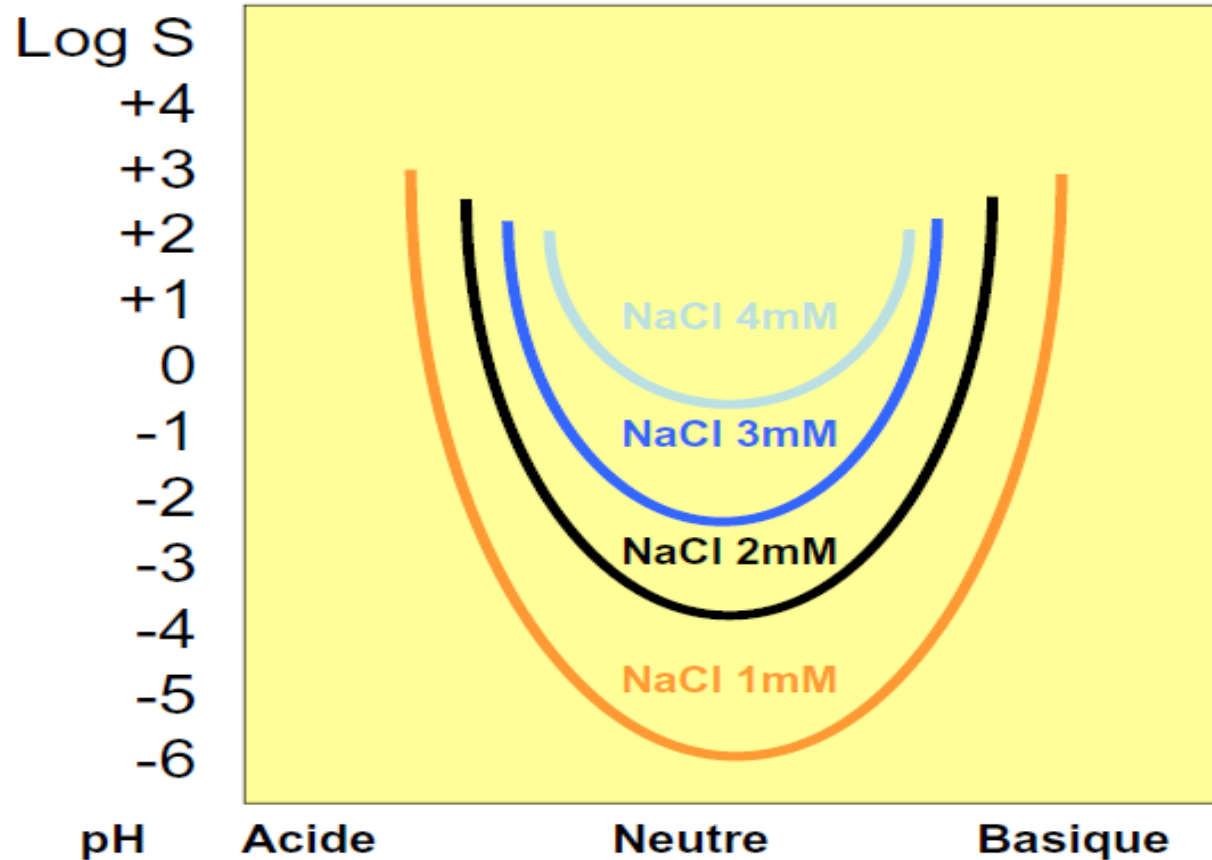
- **La solubilité d'un composé est la quantité maximale du composé qui peut se dissoudre dans un litre de solvant considéré.**
- **La solubilité des protéines dépend de certains paramètres :**
 - **- Influence de la concentration en électrolytes de la solution.**
 - **- Influence du PH.**
 - **- Influence des solvants organiques: les alcools méthyliques, l'acétone précipitent les protéines.**

Evolution de la solubilité en fonction de la force ionique



Importance de la détermination de la force ionique optimum

Evolution de la solubilité en fonction du pH

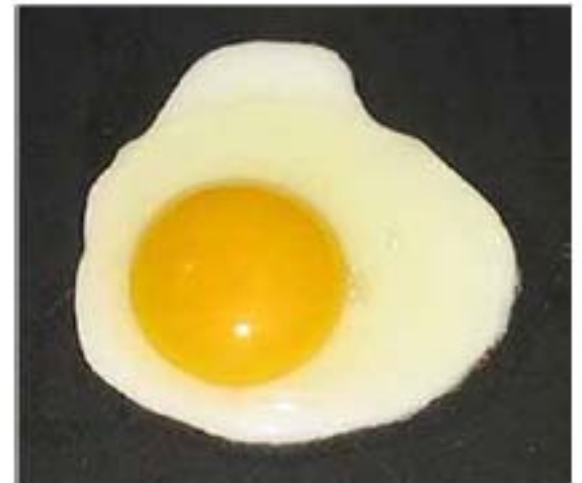


La solubilité est minimum au pH isoélectrique (valeur de pH pour laquelle la somme des charges positives et négatives est égale à 0).

La solubilité augmente avec la force ionique

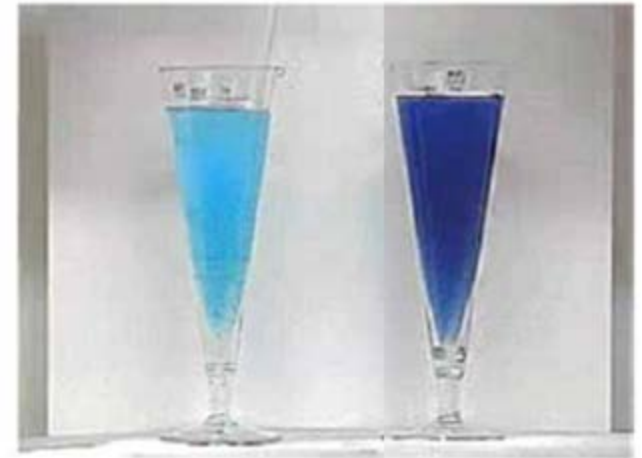
Stabilité thermique des protéines

- Froid ou chaleur provoquent la dénaturation des protéines.
- Dénaturation: modification de la structure tridimensionnelle sans modification de la structure primaire.
- Perte d'activité biologique, modification des propriétés physico-chimiques.



Autres propriétés des protéines

- **Visible:** les holoprotéines sont incolores
- **Absorption de la lumière en UV:**
 - Absorption à 200 nm (liaison peptidique)
 - AA aromatiques (absorption à 280 nm)
- **Coloration par fixation des colorants:**
 - Les protéines fixent des colorants (Rouge Ponceau, noir d'amide, Bleu de coomasie...)
- **Coloration par réaction:** permet le dosage des protéines
 - Réaction du biuret.
 - Lowry.

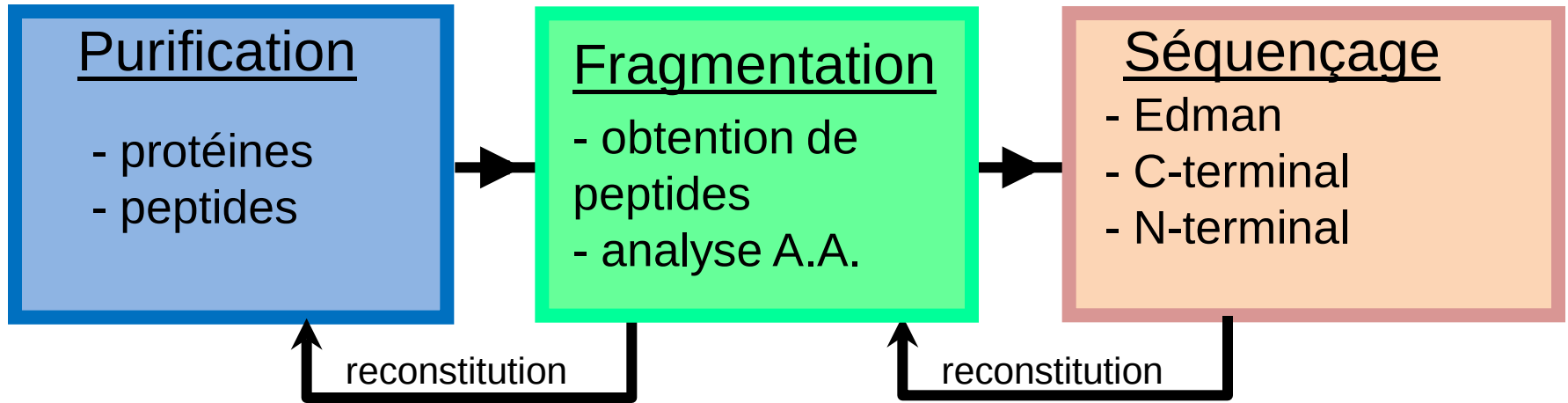


Réactif de Biuret Albumine

Détermination de la structure primaire des protéines

- I- Stratégie générale
- II- Techniques de séparation et de purification
- III- Fragmentation
 - 1- Détermination de la composition en AA (analyse)
 - 2- Coupures chimiques : CNBr, NBS
 - 3- Coupures enzymatiques
- IV- Séquençage
 - 1- Détermination du C-terminal
 - 2- Détermination du N-terminal
 - 3- Dégradation d'Edman
- V- Établissement de l'ordre dans lequel les AA sont liés.

Stratégie générale



- **La détermination** de la séquence complète en AA d'une protéine et l'ordre de ces AA passe par les étapes suivantes:
- Extraire, séparer et purifier la protéine.
- Rompre les ponts disulfures (sous unités), fragmenter la protéine, et hydrolyser la protéine (analyse = composition en Aa).
- Séquençage de la protéine et identification des Aa aux extrémités Ct et Nt.

Les techniques de purification

- Les diverses techniques pour séparer les polypeptides se base sur sa taille, sa solubilité dans un solvant particulier, sa charge ou son aptitude à se lier à un support.

Paramètre	Technique
Densité	Ultracentrifugation
Solubilité	Précipitation au sulfate d'ammonium
Taille	Filtration sur gel
Charge	Chromatographie d'échange d'ions, électrophorèse, isofocalisation.
Affinité	Chromatographie d'affinité

Ultracentrifugation

Mélange de protéines
de masses différentes

Gradient de
saccharose

Centrifuger

Force
centrifuge

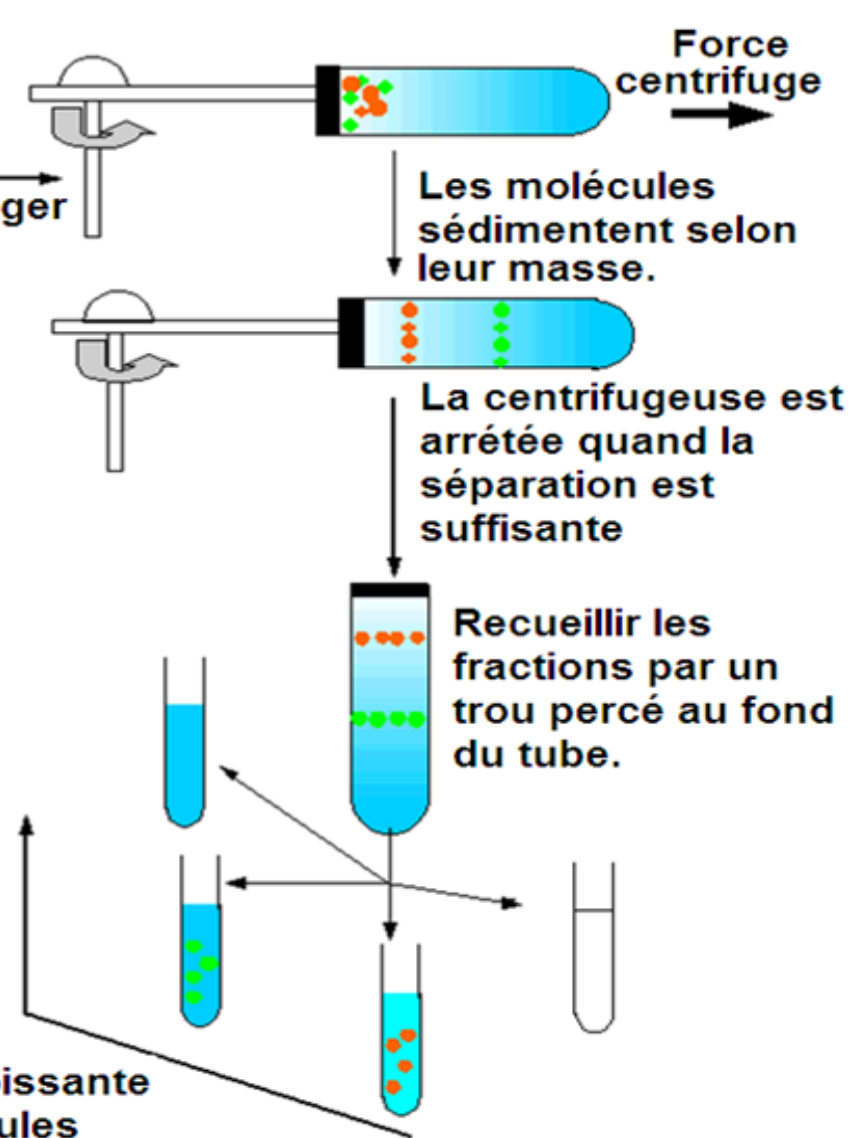
Les molécules
sédimentent selon
leur masse.

La centrifugeuse est
arrêtée quand la
séparation est
suffisante

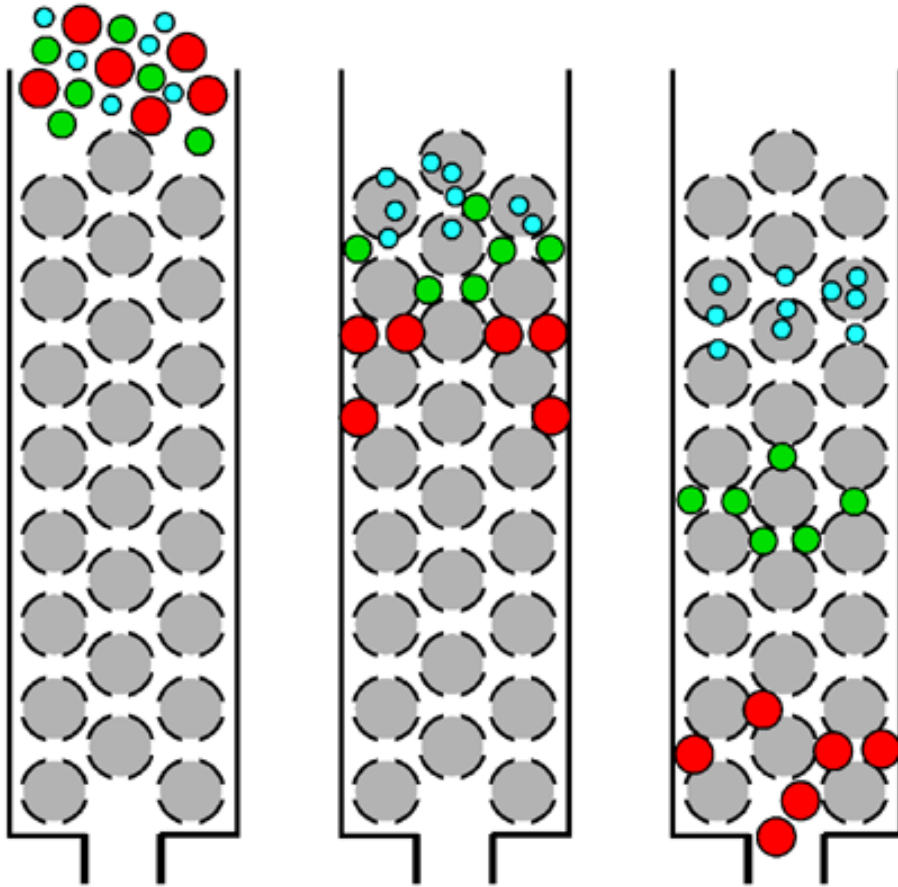
Recueillir les
fractions par un
trou percé au fond
du tube.

Masse croissante
des particules

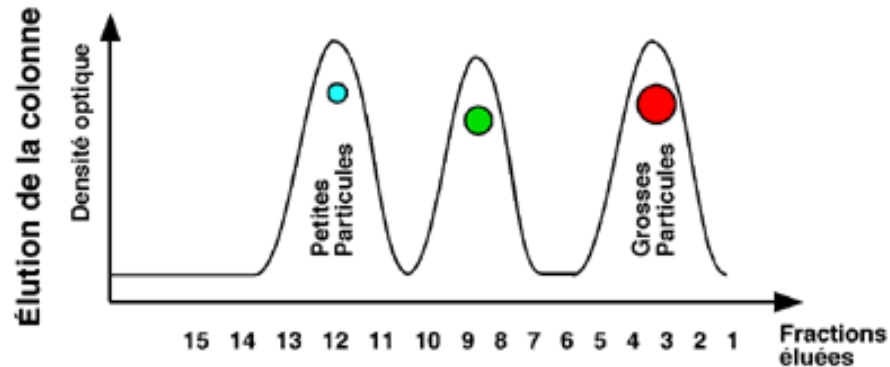
Procédé de séparation
des composés d'un
mélange en fonction
de leur différence de
densité en les
soumettant à une force
centrifuge.
L'appareil utilisé est
une machine tournante
à grande vitesse
appelée centrifugeuse



Chromatographie d'exclusion

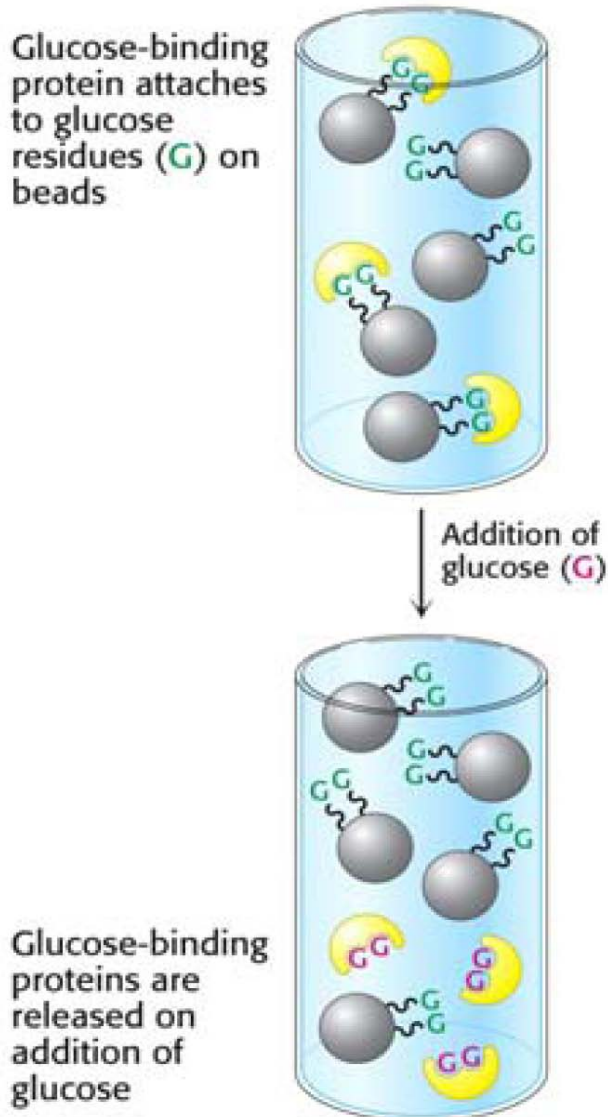


Ou chromatographie gel filtration: la séparation est basée sur la taille des protéines.



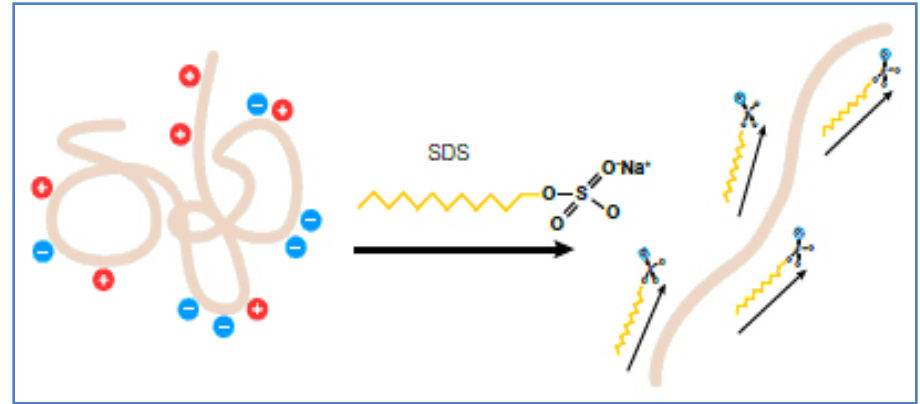
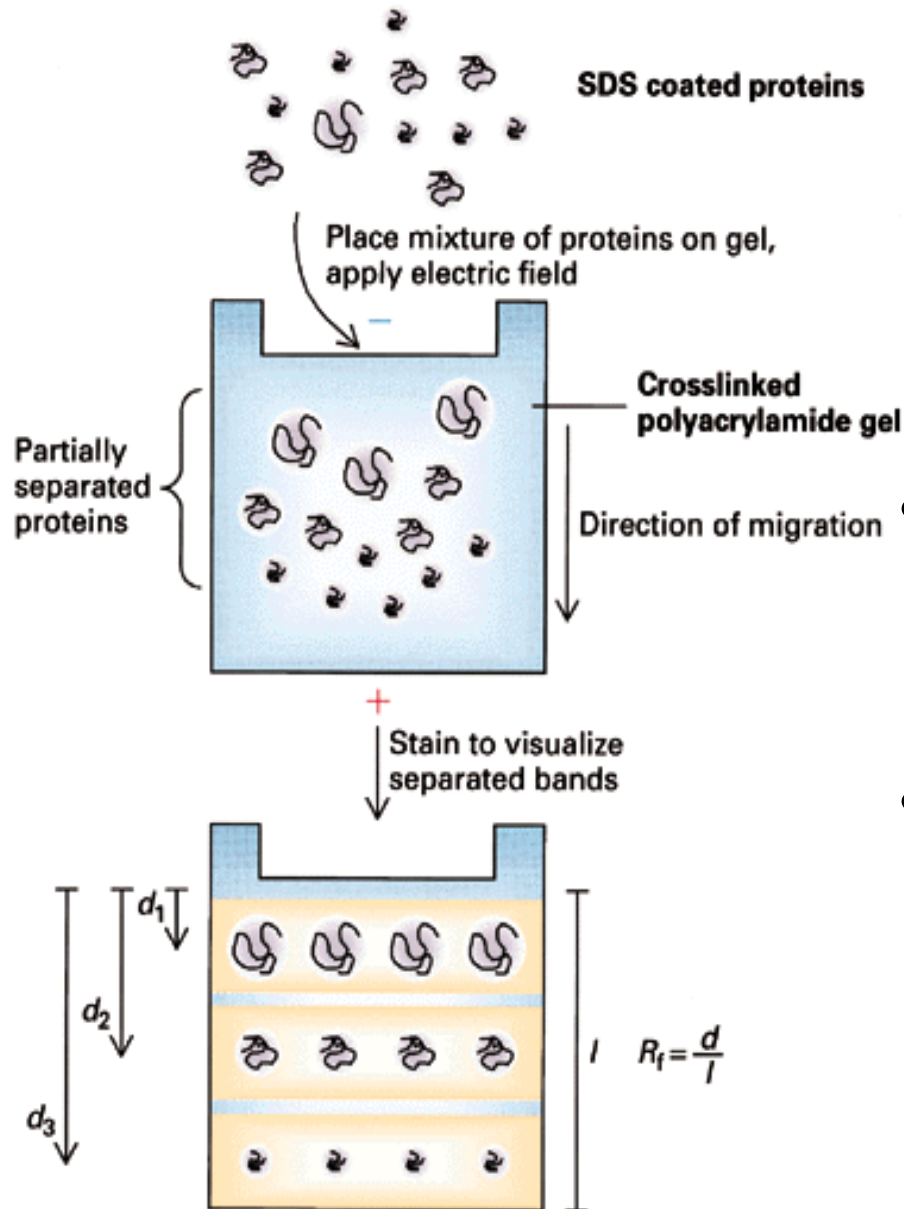
- Le gel est composé de billes trouées avec des trous de différents diamètres; les petites molécules pénètrent dans les trous et sortent tardivement et les grandes sortent les premières.

Chromatographie d'affinité



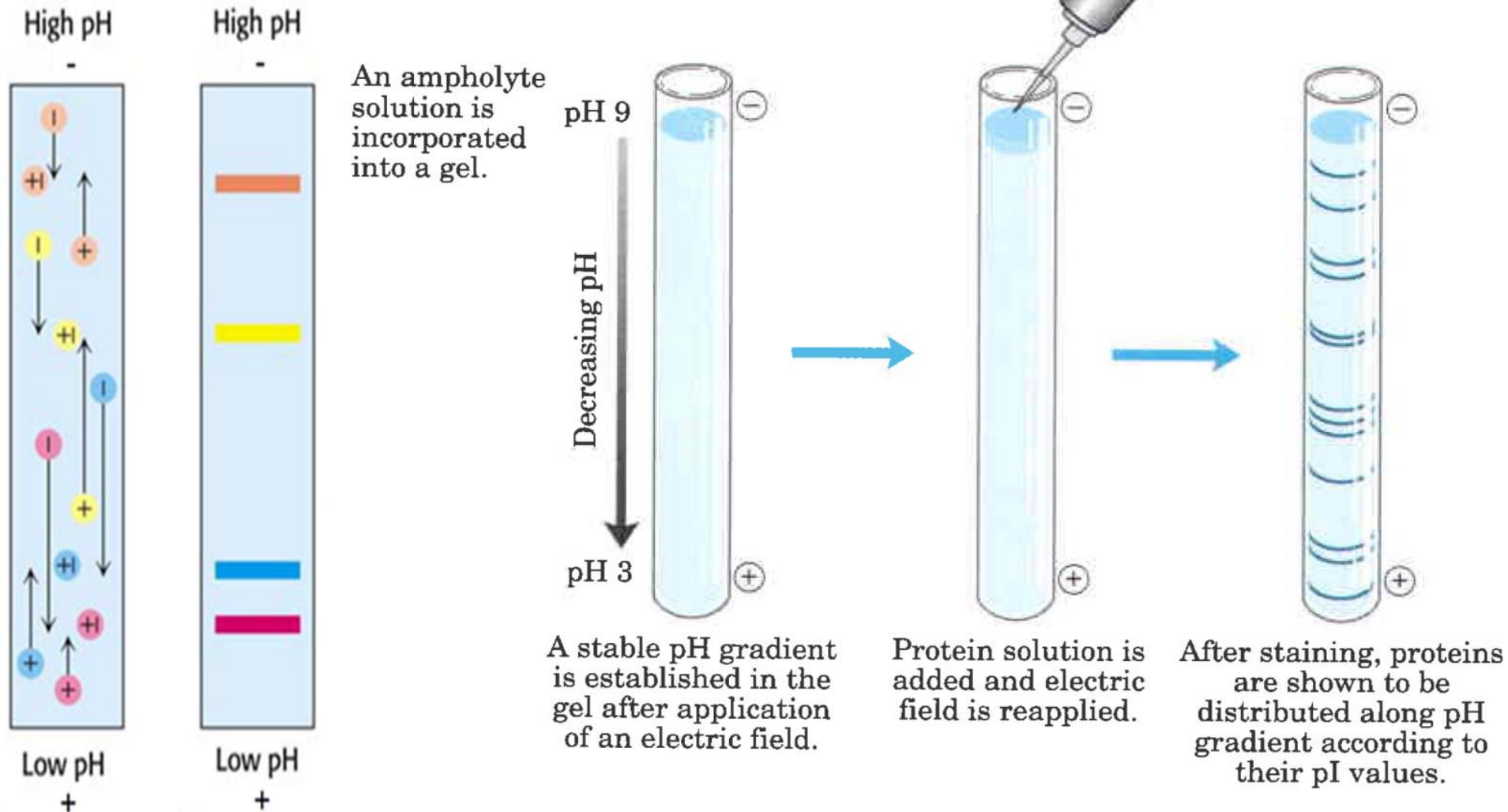
- Nécessite la reconnaissance de la protéine par un ligand porté par la phase solide
- Méthode plus efficace que la chromatographie par échange d'ions ou la chromatographie par gel filtration.
- **Condition:** il faut avoir un ligand pour la protéine recherchée.

Electrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) avec SDS



- Le Sodium dodécylsulfate (SDS), dénature les protéines.
- La séparation dans le PAGE avec SDS est fonction de la masse molaire car toutes les molécules sont chargées de la même façon.

Focalisation isoélectrique



Détermination de la composition en acides aminés

- Définition: c'est l'identification des acides aminés constitutifs d'une protéine ou d'un peptide
- Cette étape comporte :
- La rupture de la séquence peptidique par hydrolyse des liaisons peptidiques.
 - Hydrolyse chimique des liaisons peptidiques
 - Hydrolyse enzymatique
- L'analyse qualitative et quantitative des acides aminés du mélange obtenu après hydrolyse.

Hydrolyse chimique des liaisons peptidiques

- **Hydrolyse totale acide**
 - Par HCl à 6 Mol/L, à chaud (110°C), pendant 24 h environ.
 - **Inconvénients** : détruit le Tryptophane et transforme la Glutamine en Glutamate et l'Asparagine en Aspartate.
 - Méthode la plus utilisée, mais, nécessite d'autres méthodes pour compléter les résultats de l'analyse.
- **Hydrolyse totale alcaline**
 - Par NaOH à 4 Mol/L à chaud (110°C) pendant 4 à 8 heures environ.
 - **Inconvénients**: détruit la Sérine, l'Arginine, la Thréonine et la Cystéine,
 - Utilisation limité à la détermination de la teneur en Tryptophane.

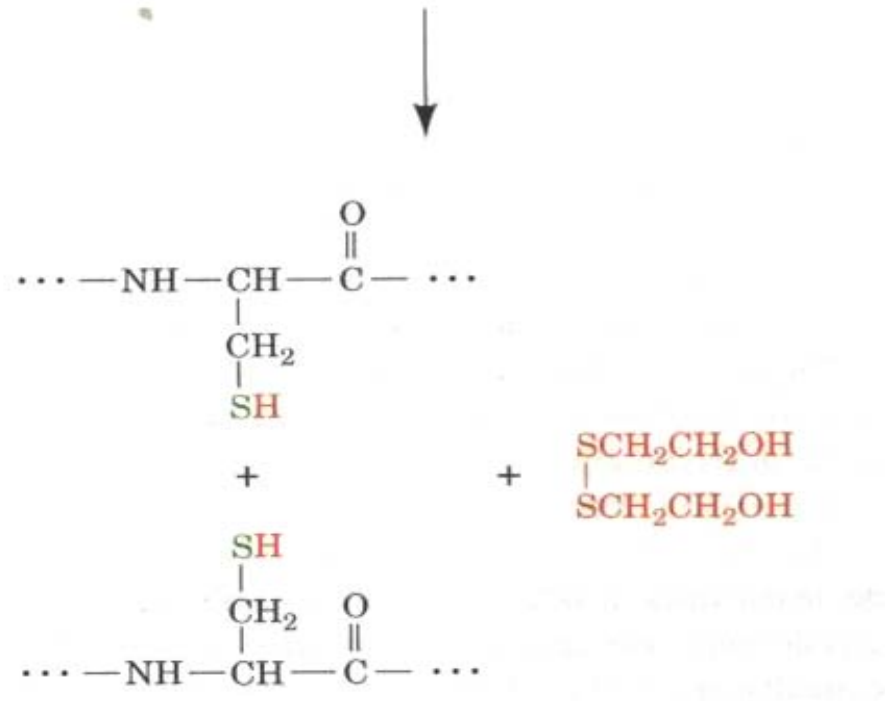
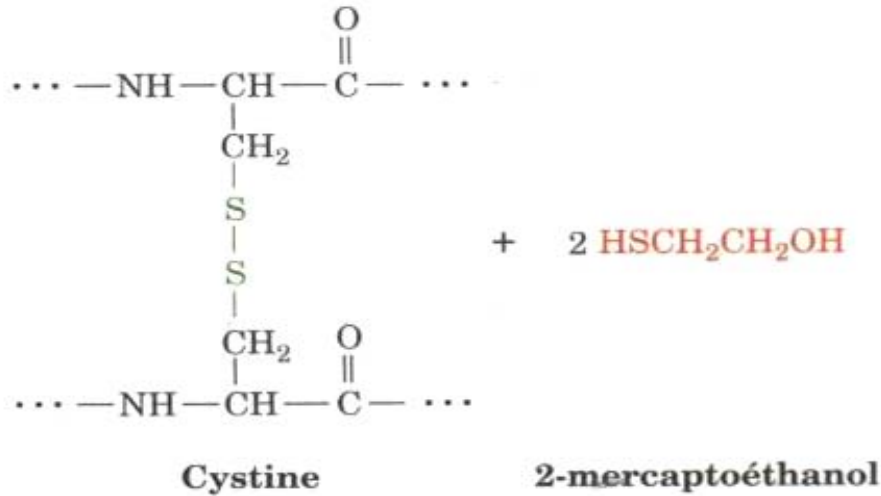
Hydrolyse enzymatique

- Protéolyse totale.
- **Pronase**= mélange de protéases extrait de *Streptomyces griseus*.
- **Intérêt**: Détermination de la teneur en Asparagine, en Glutamine et en Tryptophane d'un peptide, acides aminés (détruits par les méthodes chimiques plus sévères).
- **Inconvénient** : risque de contamination par l'autodégradation des enzymes protéolytiques.

Analyse qualitative et quantitative des acides aminés du mélange obtenu après hydrolyse

- **Comporte une séparation des acides aminés par chromatographie sur résines échangeuses d'ions, suivie du dosage de chaque acide aminé par la réaction colorée à la ninhydrine.**
- **Ceci donne la composition qualitative et quantitative du peptide (Identification des acides aminés et de leur nombre).**

Rupture des ponts disulfures



- Permet la séparation des chaînes polypeptidiques si elles sont liées par des ponts disulfure
- Empêche la conformation native qui pourrait résister à l'action des agents protéolytiques

Coupure intra-chaine chimique

Solution	Lieu de coupure
Bromure de cyanogène (BrCN)	C-terminal des méthionines
<i>N</i>-bromosuccinimide (NBS)	Après Tyr et Trp
Hydroxylamine (NH₂OH)	Liaisons Asparagine-Glycine

Coupure enzymatique intrachaine

Endopeptidases

Enzyme	Lieu de coupure
Pepsine	Avant le N des AA aromatique: Phe, Trp, Tyr
Asp N protéase	Avant le N de Asp, cystéine, parfois Glu
Trypsine	Après le C des AA basiques: Lys-Arg
Chymotrypsine	Après le C des A.A. aromatiques: Phe, Tyr, Trp
Endoprotéase V8	Après le C de Glu, parfois de Asp

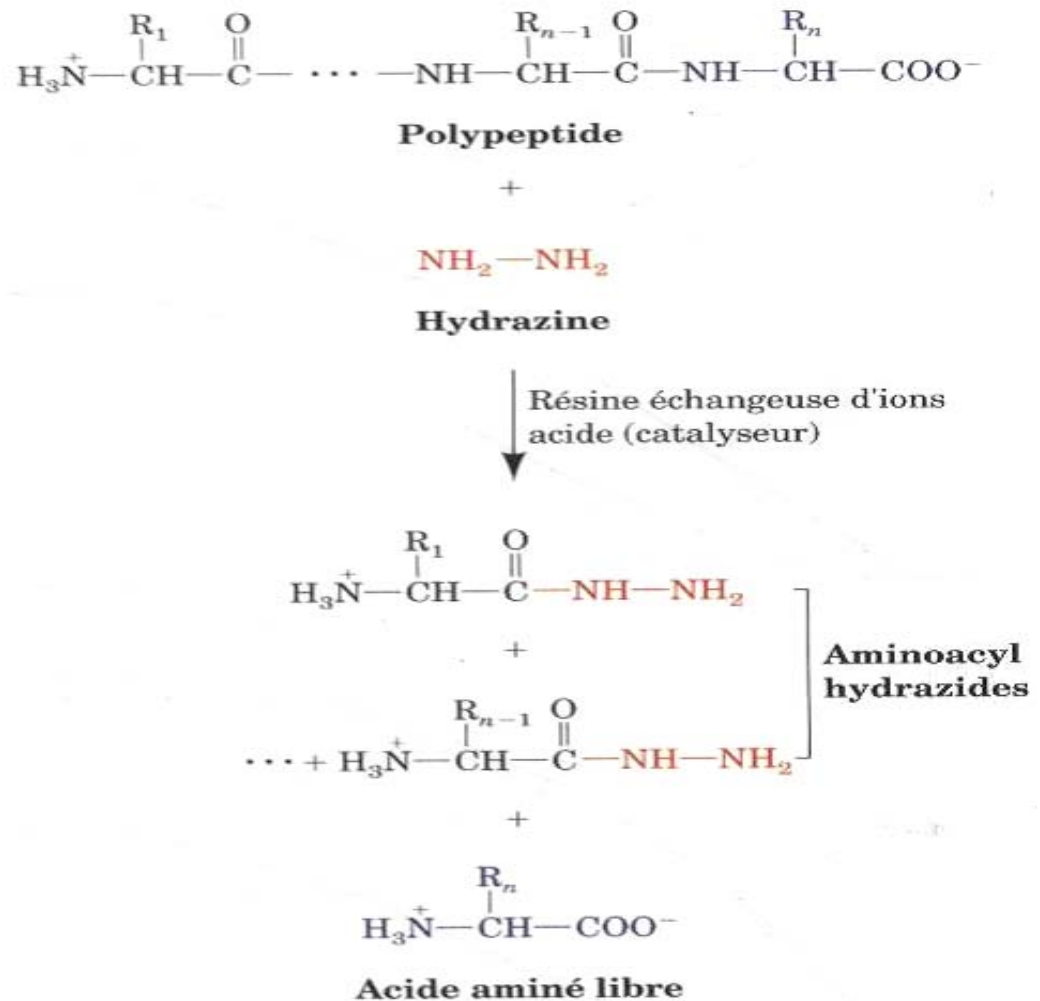
Coupure enzymatique des extrémité C et N-Ter

Exopeptidases

	Extrémité attaquée	spécificité
Carboxypeptidase A	C-ter	Arg, Lys, Pro
Carboxypeptidase B	C-ter	Arg, Lys
Carboxypeptidase C	C-ter	Tous
Carboxypeptidase Y	C-ter	Tous sauf la gly
Leucine amino peptidase	N-ter	Pro
Aminopeptidase	N-ter	Tous

Détermination du C-terminal par méthode chimique

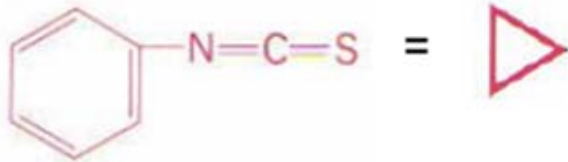
- Hydrazinolyse : $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$
- L'hydrazine à 100°C attaque toutes les liaisons peptidiques et donne des dérivés hydrazide d'acide sauf pour l'acide aminé C-terminal qui reste normal.



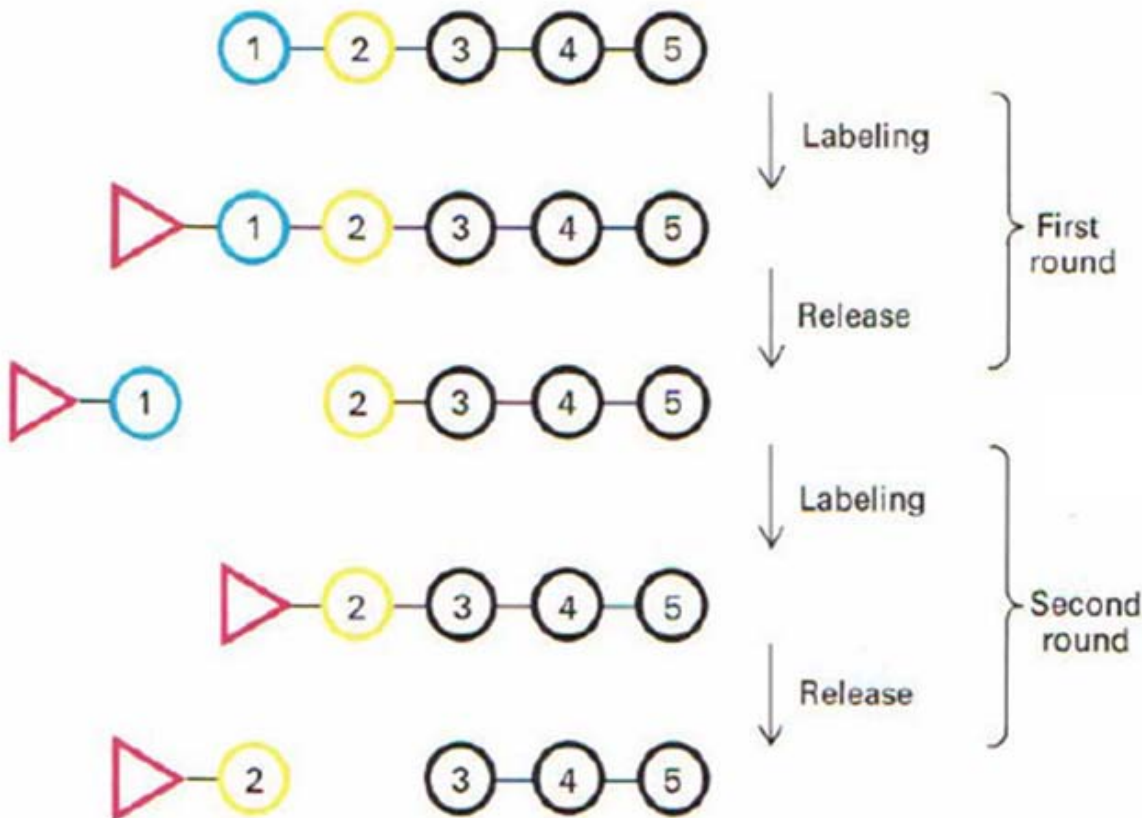
Détermination du N-terminal par méthode chimique

- **Méthode de Sanger (FDNB)**
- **Méthode de dansylation**
- **Méthode récurrente d'Edman**

Méthode récurrente d'Edman = analyse séquentielle.

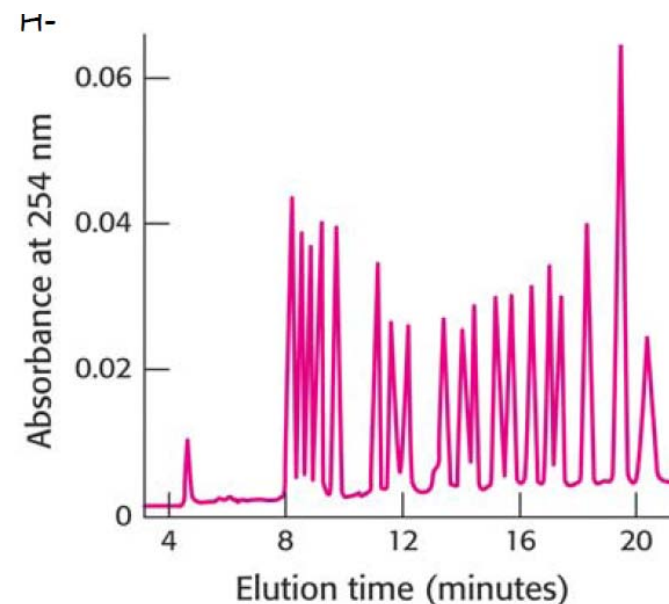


phényl isothiocyanate (PITC)

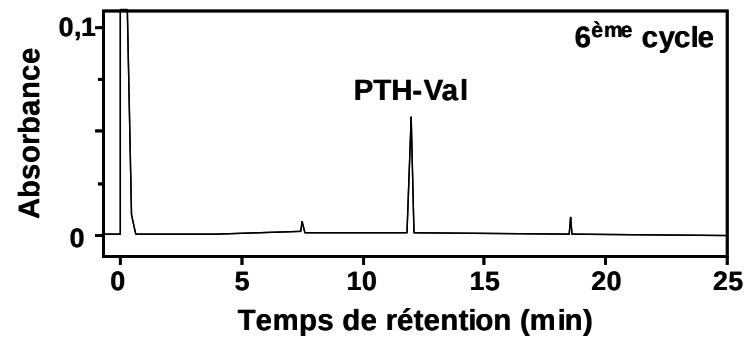
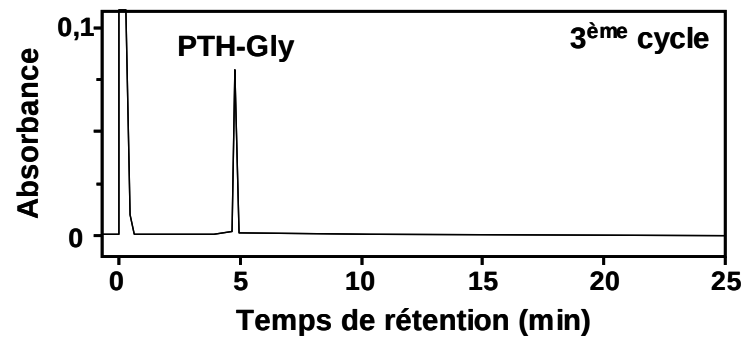
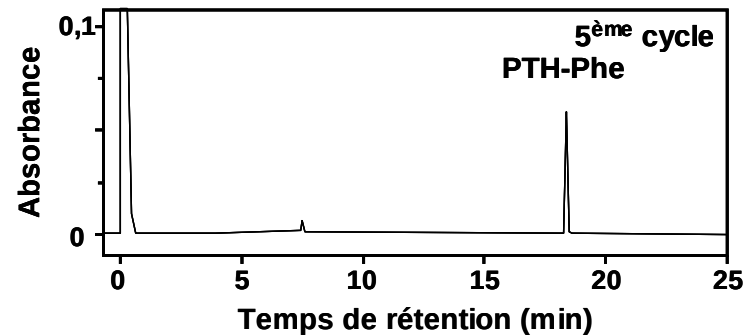
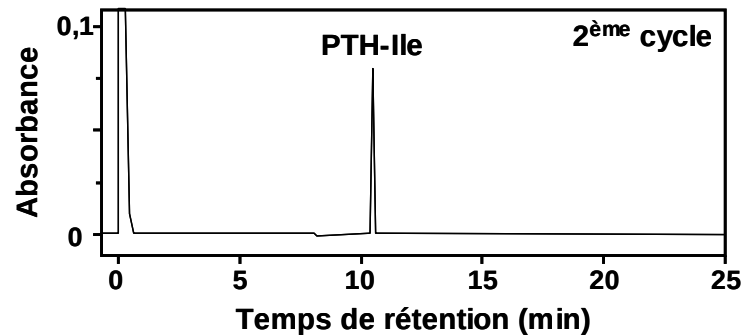
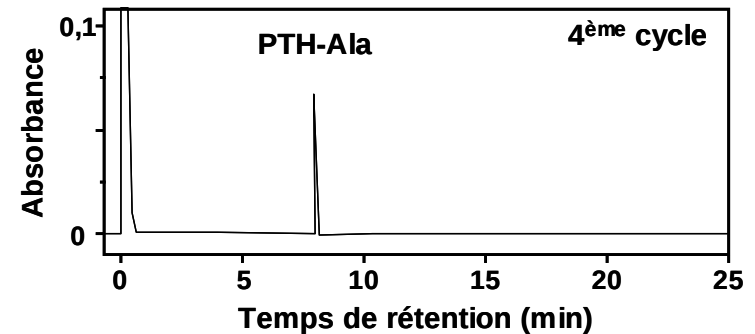
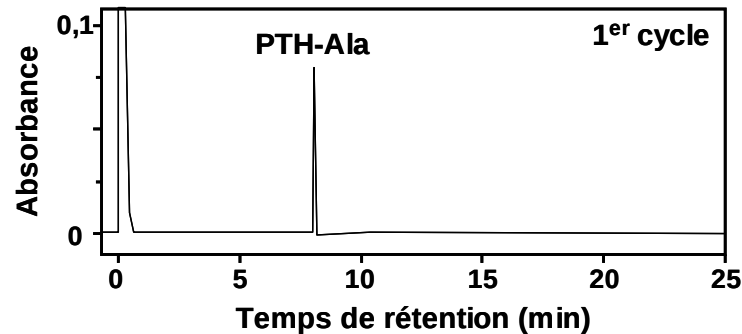


Cela permet le
séquençage de peptides
constitués de 40 à 60
résidus d'AA.

La détection des PTH-AA
se fait par HPLC



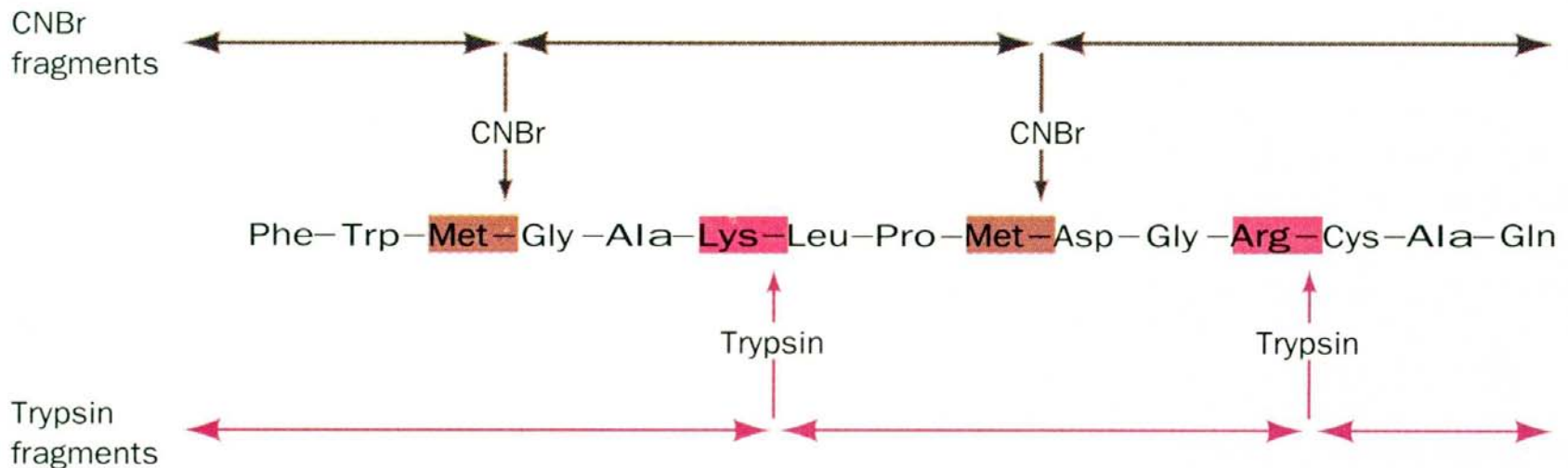
Méthode récurrente d'Edman = analyse séquentielle.



N-term **A-I-G-A-F-V...**

Détermination de la séquence en AA

- C'est l'établissement de l'ordre dans lequel les AA sont liés.
- Les fragments protéolytiques sont séparés par l'HPLC et séquencer ainsi l'un après l'autre par la méthode d'Edman après identification des extrémités C et N terminales.
- La séquence du polypeptide original est obtenue en comparant les séquences en AA d'une série de fragments peptidiques avec celles d'une deuxième série dont les sites d'hydrolyse recouvrent ceux de la première série:



Exemple

- Peptides de 14 AA.
- En N terminal= Tyrosine Y
- En C terminal = Lysine K
- Après hydrolyse acide complète, les AA suivants ont été retrouvés:
 - D;A ; G; I ; R; K; Y; Q ; M; F;
- En utilise le CNBr qui hydrolyse spécifiquement après Met (M – X) et analyse séquentielle d'Edman: on obtient
 - D - I - K - Q - M; K; K - F - A - M; Y - R - G - M
- En utilise la trypsine qui hydrolyse les liaisons peptidiques après des résidus chargés positivement (K, R) et analyse séquentielle d'Edman.
 - Q - M – K; G - M - D - I – K; F - A - M – K; Y - R

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



Le CNBr hydrolyse spécifiquement après Met (M – X)

D - I - K - Q - M

K

K - F - A - M

Y - R - G - M

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



K

K - F - A - M

D - I - K - Q - M

Y - R - G - M

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



La trypsine hydrolyse les liaisons peptidiques après des résidus chargés positivement (K, R)

Q - M - K

G - M - D - I - K

F - A - M - K

Y - R

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

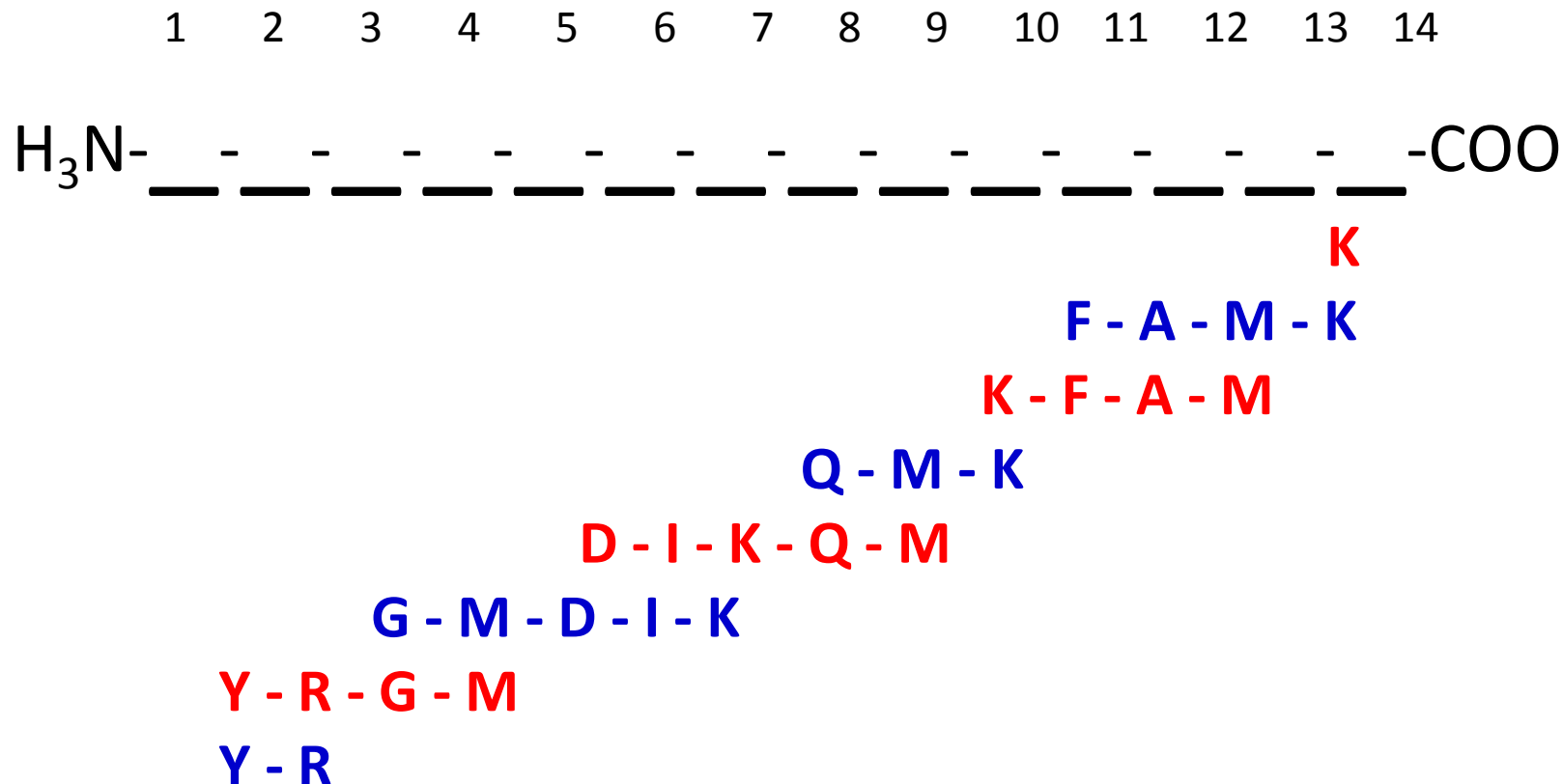


F - A - M - K

Q - M - K

G - M - D - I - K

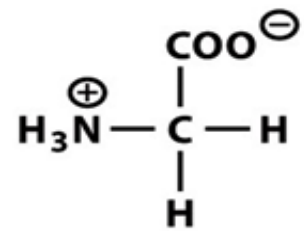
Y - R



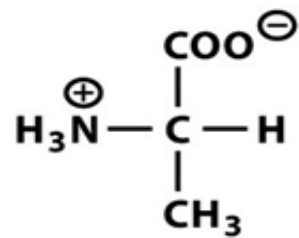
Séquence peptidique:

Y - R - G - M - D - I - K - Q - M - K - F - A - M - K

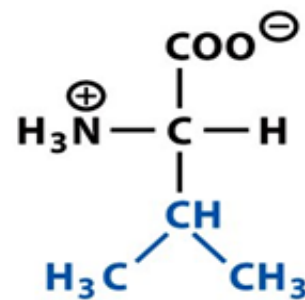
Tableau général des structures des acides aminés



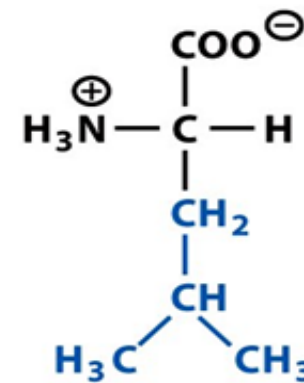
Glycine [G]
(Gly)



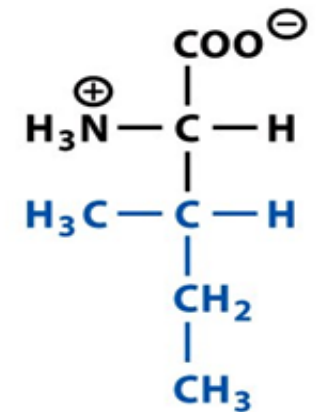
Alanine [A]
(Ala)



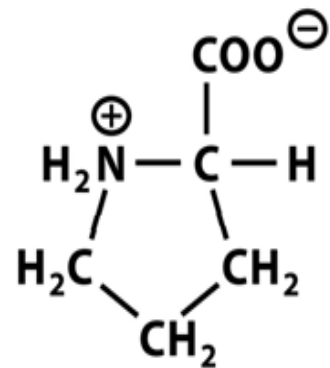
Valine [V]
(Val)



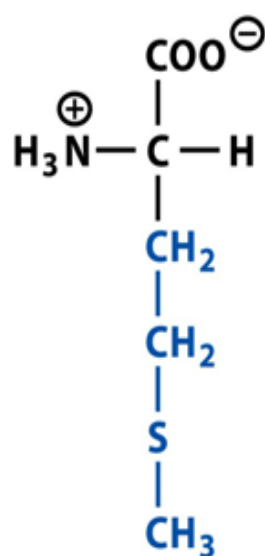
Leucine [L]
(Leu)



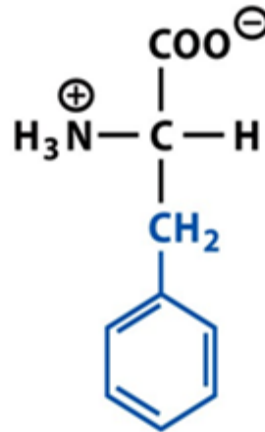
Isoleucine [I]
(Iso)



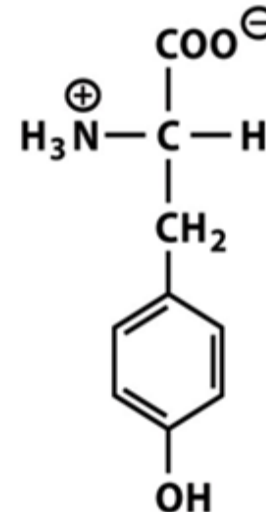
Proline [P]
(Pro)



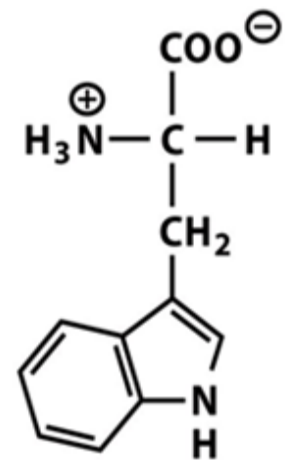
Methionine [M]
(Met)



Phenylalanine [F]
(Phe)



Tyrosine [Y]
(Tyr)



Tryptophane [W]
(Trp)

Tableau général des structures des acides aminés

